

GREGG M. SINCLAIR LIBRARY
UNIVERSITY OF HAWAII

212
ARCHIV

FÜR

MIKROBIOLOGIE

ZEITSCHRIFT FÜR DIE ERFORSCHUNG
DER PFLANZLICHEN MIKROORGANISMEN

BEGRÜNDET VON

J. BEHRENS F. BOAS A. RIPPEL

HERAUSGEGEBEN VON

A. RIPPEL-BALDES UND R. HARDER
GÖTTINGEN

14. BAND.



BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

SPRINGER-VERLAG

1950

Dieterichsche Universitäts-Buchdruckerei W. Fr. Kaestner, Göttingen

SPRINGER-VERLAG / BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

Printed in Germany

Inhaltsverzeichnis.

v. 14

Heft 1

Seite

ROBERG, MAX, Über die Lebensdauer von Aspergillus-Kulturen . . .	1
V. PLOTHO, O., Untersuchungen an Proactinomyceten	12
NIETHAMMER, A., Zur Systematik der Pilzgruppe Penicillium Link .	46
BÖMEKE, H., Über die Ernährungs- und Wachstumsfaktoren der Nitrifikationsbakterien	63
V. WITSCH, HANS, Erfahrungen und Bemerkungen zum Phycomyces- Test auf Vitamin B ₁	99
STILLE, BERND, Die Sporenkeimung von Aspergillus glaucus in Ab- hängigkeit von Temperatur und relativer Luftfeuchtigkeit . .	108
RIPPEL-BALDES, AUGUST, K. PIETSCHMANN-MEYER und W. KÖHLER, Candida (Nectaromyces) Reukauffi als Fettbildner	113
V. WITSCH, HANS, Physiologischer Zustand und Wachstumsintensität bei Chlorella	128
V. PLOTHO, O., Farbstoffe und Antibiotica bei Actinomyceten . . .	142
SUOMALAINEN, HEIKKI, Über die Anpassung der Bäckerhefe an Galaktose	154

Heft 2

V. DENFFER, DIETRICH, Die planktische Massenkultur pennater Grund- diatomeen.	159
PETERS, I., und A. RIPPEL-BALDES, Über das Vorkommen verschiedener Rassen von Aspergillus niger van Tiegh. im Boden	203
REMY, ELLEN, Über niedere Bodenphycomyceten	212
WINTER, A. GERHARD, Untersuchungen über die Beziehungen zwischen Ophiobolus graminis und anderen Organismen mit Hilfe der Aufwuchsplattenmethode	240
BÖMEKE, H., Die obligate Autotrophie der Nitrifikationsbakterien. .	271
WINDISCH, SIEGFRIED, Sporobolomyces holsaticus n. sp.	287
MÜLLER, ADELHEID, und W. SCHWARTZ, Untersuchungen zur Erdölbakteri- ologie I.	291
BURCIK, ERWIN, Eine Kritik der Symbiosetheorie von H. Schanderl auf Grund neuerer eigener Untersuchungen	309
RIPPEL-BALDES, AUGUST, Über die angebliche Stickstoffbindung durch Nicht-Leguminosen	332
FISCHER, WILHELM, Über einige Fehlerquellen bei der Prüfung von Pflanzenteilen auf das Vorkommen von Bakterien	343

Heft 3

FISCHER, WILHELM K., Untersuchungen zur Stammfrage bei Azotobacter chroococcum Beij.	353
BRENDEMÜHL, INGE, Über die Verbreitung der Erddiatomeen. . . .	407
BORTELS, H., Mikrobiologischer Beitrag zur Klärung der Ursachenfrage in der Meteorobiologie	450
RIPPEL, KARL, Der biologische Säureabbau im Wein.	509

	Seite
BEHREND, HERTA, Notiz über die Wirkung intermittierenden Lichtes auf das Wachstum der Diatomeen	531
BURCIK, ERWIN, Zur Methodik der Beweglichkeitsprüfung von Mikro- organismen	534

Heft 4

WINDISCH, SIEGFRIED, Zur Frage der Endokonidienbildung bei Sporen- donema casei Desm.	539
MOEWUS, FRANZ, Beiträge zur Systematik der Volvocales-Gattung Polytoma. I. Die Arten mit kugeligen Formen	542
STILLE, BERND, Untersuchungen über den Kältetod von Mikroorganismen	554
WINTER, A. GERHARD, Weitere Beobachtungen über das Zusammen- leben von Ophiobolus graminis und anderer Bodenmikroben mit Hilfe der Aufwuchsplatten	588
JOHANNES, HEINRICH, Zwei neue Arten der Saprolegniaceen	594
KATHEN, HANS, Über die Ermittlung der chemischen Konstitution von Algenlipoiden mit Hilfe der Absorptionsmethode	602
KOCH, WULF, Entwicklungsgeschichte und physiologische Unter- suchungen an Laboratoriumskulturen der Rotalge Trailliella intricata Batters	635
HOPF, MARIA, Untersuchungen über die natürliche Mikroflora des Bodens	661
KÜHLWEIN, H., Beiträge zur Biologie und Entwicklungsgeschichte der Myxobakterien	678
ROBERG, MAX, Keimung verschieden alter Konidien von Aspergillus und Wachstum aus ihnen gezogener Mycelien.	705

Über die Lebensdauer von *Aspergillus*-Kulturen.

Von

Max Roberg, Breslau.

(Eingegangen am 30. März 1944.)¹

Beobachtungen über die Lebensdauer einer großen Anzahl von Pilz-Kulturen, u. a. auch von *Aspergillus*, die in Reagensgläsern auf Agar-nährböden gezogen waren, veröffentlichte kürzlich Zobl. Da ich früher selbst einige derartige Versuche mit *Aspergillus*-Arten angestellt hatte und noch eine Reihe vieljähriger Kulturen besaß, untersuchte ich diese nunmehr auf ihren Lebenszustand. Mein Material unterscheidet sich von dem Zobls durch ein beträchtlich höheres Alter, waren seine ältesten Kulturen 29 Monate alt, so schwankten meine zwischen 10 und 15 Jahren.

Eigene Versuche.

Alle Pilze lagen in Reinkulturen vor, die in Reagensgläsern, 20 × 180 mm, mit Watteverschluß auf festen Nährböden — Malz-extraktagar oder Kartoffelschnitzel — gewachsen waren. Die völlig eingetrockneten Kulturen waren die ganze Zeit über in Papier verpackt in einem verschlossenen Holzkasten bei Zimmertemperatur aufbewahrt worden; Verunreinigungen ließen sich nicht nachweisen. Folgende 14 *Aspergillus*-Arten standen in insgesamt 24 Rassen zur Verfügung:

<i>Aspergillus amoenus</i> Roberg,	<i>Aspergillus glaucus</i> Link, Rasse I, II
„ <i>candidus</i> (Link?) Wehmer,	und III,
„ <i>cinnamomeus</i> Schiemann,	„ <i>nidulans</i> Eidam,
„ <i>clavatus</i> Desmazières,	„ <i>niger</i> van Tieghem ²
„ <i>Ficum</i> (Reichardt) Hen-	Rasse Berlin,
nings,	„ <i>Fulda</i> ,
„ <i>Fischeri</i> Wehmer,	„ <i>Göttingen alt</i> ,
„ <i>flavipes</i> Bainier et Sartory,	„ <i>Göttingen neu</i> ,
„ <i>flavus</i> Link, Rasse Baarn,	„ <i>Münster I</i> ,
„ „ Roberg,	„ <i>Münster II</i> ,
„ „ Wehmer,	„ <i>Zwetsche</i> ,
„ <i>fumigatus</i> Fresenius,	„ <i>niger altipes</i> Schiemann.
„ <i>fuscus</i> Schiemann, = <i>Asp.</i>	
<i>Schiemannii</i> (Schiem.)	
Thom,	

¹ Diese Arbeit lag bereits fertig gedruckt in Heft 5, Band 13, S. 486 dieser Zeitschrift vor; das Heft wurde nach Fertigstellung durch Kriegseinwirkung in der Druckerei zerstört.

² Bezüglich dieser Rassen siehe Behr und Roberg.

Zunächst wurden von allen Kulturen *mehrere* Abimpfungen auf sterilen Nährböden vorgenommen, die sich in Reagensgläsern mit Watteverschluß befanden und je nach dem Wärmebedürfnis der Pilze bei Zimmertemperatur — um 18° C — oder im Thermostaten bei 34° C aufbewahrt wurden: Malzextrakt-Bierwürze-Agar, Kartoffel¹ und zum Teil auch Weißbrot. Bei der stets reichlichen Abimpfung wurde nach Möglichkeit nur Konidienmaterial übertragen, allerdings war bei den Askussporen-bildenden Arten eine Trennung von diesen nicht möglich². Tabelle I gibt die Pilzkulturen an, von denen Abimpfungen gelangen. Es sei noch erwähnt, daß die aus den alten Konidien gezogenen Mycelien wie die gebildeten Konidien normales Aussehen hatten.

Tabelle I. Keimung alter und junger Konidien verschiedener *Aspergillus*-Arten auf Bierwürze-Malzextrakt-Agar.

<i>Aspergillus</i>	Temperatur °C	Alter der Kultur in Jahren	Keimung ihrer Konidien frei sichtbar in Tagen	Keimung junger Konidien frei sichtbar in Tagen
<i>amoenus</i>	18	12	4	2
<i>glaucus</i> , Rasse I, II, III	18	15	5	2
„ „ III	18	12	5	2
<i>candidus</i>	18	12	7	2
<i>Fischeri</i>	34	10	2	1
<i>flavus</i> , Rasse Roberg	34	12	2	1
<i>fumigatus</i>	34	12	1	1
<i>fuscus</i>	34	10	2	1
<i>Ficuum</i>	34	10	2	1
<i>niger</i> , Rasse Fulda	34	12	2	1
„ „ Göttingen alt	34	12	2	1
„ „ „ neu	34	12	2	1
„ „ Münster I	34	11	2	1
„ „ „ II	34	12	2	1
„ „ Zwetsche	34	12	2	1
<i>niger alipes</i>	34	12	2	1

Die Kulturen, von denen Abimpfungen nicht gelangen, d. h. deren Konidien auf den Nährböden nicht auskeimten, wurden nunmehr nach dem Vorbild von *Wehmer* mit Nährlösung — Bierwürze-Malzextrakt-lösung — übergossen. Jetzt zeigten Leben:

<i>Aspergillus nidulans</i>	Alter der Kultur: 12 Jahre
„ <i>niger</i> , Rasse Berlin	„ „ „ 12 „
„ <i>flavus</i> , Rasse Baarn	„ „ „ 12 „
„ <i>fumigatus</i>	„ „ „ 15 „
„ <i>Ficuum</i>	„ „ „ 12 „

¹ Im Autoklaven sterilisierte Kartoffel erwies sich für alle Pilze als gutes Nährmedium. — ² Nach *Blochwitz* sollen Askussporen länger keimfähig bleiben und nach *Brefeld* hatten bei *Penicillium glaucum* die Askussporen eine längere Lebensdauer als die Konidien, während letztere bereits nach 1½ bis 1¾ Jahren abgestorben waren, keimten die Askussporen noch nach 2 Jahren aus.

Kein Leben zeigten:

<i>Aspergillus cinnamomeus</i>	Alter der Kultur: 12 Jahre
„ <i>clavatus</i>	12 „
„ <i>flavus</i> , Rasse <i>Wehmer</i>	12 „
„ <i>Fischeri</i>	12 „
„ <i>fuscus</i>	12 „
„ <i>niger</i> , Rasse <i>Münster I.</i>	13 „

Diese letztgenannten Kulturen können als abgestorben betrachtet werden.

Um zu sehen, ob durch das Alter die Konidien der eingetrockneten Kulturen in ihrer Keimkraft gelitten hatten und sie daher vielleicht eine längere Keimzeit benötigten als junge, wurden zum Vergleich mit den erhaltenen *jungen* Konidien Nährböden beimpft. Wie ebenfalls aus der Tabelle I hervorgeht, war die Keimdauer dieser jungen Konidien gegenüber der Keimdauer alter Konidien abgekürzt.

Vergleich der erhaltenen Ergebnisse mit den Angaben im Schrifttum.

Aspergillus clavatus Desmazières.

Bei *Wehmer* keimten 2½ jährige Konidien von *Asp. clavatus* nicht mehr aus, nach Übergießen mit Nährlösung zeigte die Kultur aber noch Leben. Gleichaltriges Material erwies sich früher bei mir und später bei *Zobl* als keimfähig. Eine 5 jährige Kultur fand *Siebenmann* abgestorben.

Bei meinen vorliegenden Versuchen besaß eine Kultur nach 12 Jahren keine Keimfähigkeit mehr. *Asp. clavatus* scheint daher nur ein Alter von wenigen Jahren erreichen zu können.

Aspergillus Fischeri Wehmer.

1½ jährige Kulturen dieses Pilzes waren nach *Zobl*, 5 jährige nach eigenen Versuchen vermehrungsfähig.

Bei meinen jetzigen Versuchen erwies sich eine 12 jährige Kultur als abgestorben, von einer 10 jährigen keimten dagegen die Konidien noch aus. Die maximale Lebensdauer dürfte demnach um 11 bis 12 Jahre liegen.

Aspergillus flavus Link.

Über die Lebensdauer von *Asp. flavus* liegen verschiedene Angaben vor. *Siebenmann* fand 5 jährige Kulturen noch lebend und *Hansen* hält als obere Grenze der Keimfähigkeit — bei *Asp. flavescens* = *flavus* — etwa 8 Jahre. Die Ergebnisse späterer Autoren fallen daher nicht aus der Reihe; es erwiesen sich vermehrungsfähig: nach eigenen Versuchen 5 jährige, nach *Wehmer* nicht genau 6 jährige und nach *Brefeld* 6 jährige Kulturen. Nach *Thom* und *Church* hatte weiter *Asp. flavus* bei *Wehmer* noch nach 9 Jahren seine Keimkraft behalten, die nach 20 Jahren jedoch erloschen war.

Für meine jetzigen Versuche standen drei Rassen zur Verfügung *Roberg*, *Baarn* und *Wehmer*. Die letztgenannte war nach 12 Jahren

abgestorben, die Rasse *Baarn* zeigte nach Zugabe von Nährflüssigkeit zur eingetrockneten Kultur noch Leben, während die Konidien der ersteren noch nach dieser Zeit auf Nährböden auskeimten. Die Lebensdauer der einzelnen Rassen von *Asp. flavus* ist, wie aus obigem Material hervorgeht, individuell verschieden. Nach 12 Jahren war eine Rasse tot, eine andere zeigte noch tadellose Keimfähigkeit, während die dritte betreffend maximaler Lebensdauer bzw. Keimfähigkeit in der Mitte stand und nach dieser langen Zeit zum größten Teil abgestorben war, aber dennoch über gewisse keimfähige Kräfte verfügte. Wahrscheinlich hätte nach weiteren 1 bis 2 Jahren auch diese Rasse kein Leben mehr gezeigt.

Nach 12 Jahren war die Keimkraft der Rasse *Roberg* nur wenig geschwächt, da die Konidien bei 34° C innerhalb von 2 Tagen und bei etwa 18° C innerhalb von 6 Tagen auskeimten¹, während die Keimkraft der von *Brefeld* benutzten Rasse bereits nach 6 Jahren stärker gelitten haben muß, hatten die Konidien bei Zimmertemperatur doch eine Keimdauer von 2 Wochen.

Aspergillus fumigatus Fresenius.

Eidam beobachtete, daß 10 Jahre alte Konidien von *Asp. fumigatus* in Nährlösungen innerhalb eines Tages auskeimten. *Wehmer* bezweifelte diesen Befund, da eigenes Material bereits nach wenigen Jahren seine Keimkraft verloren hatte und 6 jährige Konidien niemals mehr auswuchsen. Früher fand ich und später *Zobl* 2½ jährige Konidien noch keimfähig.

Bei meinen jetzigen Versuchen erwiesen sich die Konidien von einer 12 jährigen Kultur voll lebensfähig, ihre Keimkraft war jungem Material gegenüber kaum geschwächt; wie bei *Eidam* bildeten sie innerhalb 24 Stunden auf frischem Nährsubstrat Mycel. Steril blieben Konidienaussaaten von einer 15 jährigen Kultur. Als diese aber mit Nährlösung überschichtet wurde, bildete sich eine feste Pilzdecke mit guter Konidienfruktifikation, ein Zeichen, daß unser Pilz nicht völlig abgestorben war; seine maximale Lebensdauer dürfte über 15 Jahre liegen. Daß diese aber neben einer Art- in erster Linie eine Stammes-eigentümlichkeit ist, geht aus den entgegengesetzten Befunden *Wehmers* hervor, der daraufhin zu Unrecht gegen die Angaben von *Eidam* Zweifel hegte. Von Interesse ist noch folgendes: In zwei Gasthermostaten des hiesigen Instituts wurden in früheren Jahren, zuletzt 1926/27, sehr viele Kulturen thermophiler Mikroorganismen, u. a. auch von *Asp. fumigatus*, gezogen. In diesem Jahr konnte in beiden Brutschränken auf sterilen Nährböden mit Leichtigkeit *Asp. fumigatus* eingefangen werden. Diese Infektionen müssen auf Konidien zurückgehen, die also mindestens 18 Jahre alt sind: ein zufälliger Befund, der ebenfalls die Langlebigkeit der Konidien dieses Pilzes zeigt.

Aspergillus glaucus Link.

Neben *Asp. Oryzae* kann nach der Literatur von allen *Aspergillus*-Arten *Asp. glaucus* das höchste Alter erreichen. *Hansen* berichtete, daß dieser

¹ Junge Konidien keimten bei 34° C innerhalb von 1 Tag und bei Zimmertemperatur innerhalb von 2 Tagen.

Pilz noch nach 16 jähriger Aufbewahrung lebend war. *Zobl* beobachtete Keimfähigkeit nach $1\frac{1}{2}$, ich früher nach 5 und *Blochwitz* nach 9 Jahren¹. Bei *Wehmer* war die Lebensdauer der Konidien eine viel geringere, sie ging im allgemeinen nicht über 1—2 Jahre hinaus, ja war mehrfach nach 8 Monaten bereits erloschen. Nun läßt sich gerade bei *Asp. glaucus* eine scharfe Trennung der Konidien von den meist massenhaft gebildeten Perithezien bzw. Askussporen beim Abimpfen nicht durchführen und so ist es nicht klar, auf wessen Keimung dann das junge Mycel zurückgeht. Um dies einwandfrei zu entscheiden, müßten Keimversuche unter mikroskopischer Kontrolle durchgeführt werden.

Aus einer Rohkultur waren seinerzeit mehrere Einsporkulturen gezogen worden, von denen jetzt noch drei zur Verfügung standen. Da sie aus derselben Ausgangskultur stammen, ist es fraglich, ob wirklich alle drei unterschiedliche Rassen darstellen oder ob sie — was wahrscheinlicher scheint — auf eine *gemeinsame* Einzelkultur zurückgeführt werden können und nur Stämme einer Rasse sind. Wie dem auch sei, von allen drei Kulturen gelangen Abimpfungen noch nach 15 Jahren, wenn auch zu beobachten war, daß ein beträchtlicher Teil der Konidien nicht mehr auskeimte und daß beim Verimpfen von wenig Sporenmaterial die Kulturböden verschiedentlich steril blieben. Als Nährböden wurden außer den oben genannten noch stets Pumpernickel benutzt. Daß 12 Jahre altes Material von Rasse III sich, wie zu erwarten, ebenfalls als keimfähig erwies, ist ohne Belang bis auf die Beobachtung, daß anscheinend nicht so viele Konidien abgestorben waren als nach 15 jähriger Aufbewahrung.

Die maximale Lebensdauer unserer Rassen liegt über 15 Jahre und die Angabe von *Hansen* über 16 Jahre altes lebendes Material kann daher kaum mehr bezweifelt werden.

Aspergillus nidulans Eidam.

Von *Asp. nidulans* fand *Eidam* $1\frac{1}{2}$ - bis 2 jährige Kulturen, *Zobl* $1\frac{1}{2}$ -jährige und ich früher $2\frac{1}{2}$ jährige noch voll lebensfähig.

Nunmehr keimten die Konidien von 12 jährigem Material auf den benutzten Nährböden nicht mehr aus. Als die eingetrocknete Kultur mit Nährlösung überschichtet wurde, wuchsen von *einigen wenigen* Stellen Mycelien aus, die dann eine feste Decke mit starker Konidienfruktifikation bildeten. Die maximale Lebensdauer des Stammes dürfte daher nur wenig über 12 Jahre liegen, während dieser Zeit sind jedoch die weitaus meisten Konidien bereits abgestorben. Da *Asp. nidulans* auch Perithezien bildet, kann nicht gesagt werden, welche Teile des Pilzes die gezeigte lange Lebensdauer besitzen, Mycel, Konidien oder Askussporen.

¹ Bei *Blochwitz* muß die Lebenskraft der Konidien nach dieser Zeit bereits gelitten haben, da das aus ihnen gezogene Mycel nur farblose Konidien zu produzieren vermochte.

Aspergillus niger van Tieghem u. *Aspergillus Ficum* (Reich.) Hennings.

Von *Asp. niger*, diesem so häufig benutzten Versuchspilz der Laboratorien, liegt das größte Material über die uns hier interessierende Frage vor:

Nach *de Bary* u. a. keimten über 1 Jahr alte Konidien, *Siebertmann* fand 5 Jahre alte noch lebend, *Brefeld* beobachtete ein etwas geschwächtes Auskeimen von 5 Jahre alten und *Hansen* hält als obere Lebensgrenze etwa 6 Jahre. *Wehmer* stellte Versuche mit verschiedenen alten Konidien an und sah, daß viele schon nach 1 Jahr tot waren, die übrigen lebensfähigen aber nur eine träge Entwicklung zeigten, also bereits stark geschwächt waren; von nicht ganz 3 Jahre alten Kulturen erwiesen sich fast alle Konidien als abgestorben, nur wenige wuchsen noch aus. Dreijähriges Aufbewahren stellt nach *Wehmer* die Keimfähigkeit bereits stark in Frage, für den Durchschnitt veranschlagt er die Lebensdauer trocken liegender Konidien nicht viel höher als 1 Jahr. Mit diesen Angaben steht er im Gegensatz zu den meisten der obigen Autoren, während die Ergebnisse von *Zobl* dagegen eine gewisse Bestätigung bringen. Bei diesem keimte die erste Rasse, allerdings sehr langsam, noch nach 2½ Jahren, die zweite nach 1½ Jahren ohne Schwierigkeit, aber nicht mehr nach 2½ Jahren und genau so verhielt sich eine dritte Rasse. Ich selbst hatte früher gefunden, daß die aus wenige Tage wie 16 Monate alten Konidien hervorgegangenen Mycelien ein gleich kräftiges Wachstum zeigten. Eine gewisse Beeinflussung des Mycelgewichtes durch das Alter der Sporen fanden *Frey* und *Poschenrieder*. Daß das Alter der Konidien einen Einfluß auf das physiologische Verhalten des Mycels haben kann, wie u. a. *Schwartz* und *Lang*, *Rippel* und *Kreutzmann* sowie *Paley* feststellten, interessiert hier weniger.

Nun standen für die Versuche 7 verschiedene Rassen und 3 Mutanten von *Schiemann* zur Verfügung. Von 5 Rassen keimten noch 12 Jahre alte Konidien ohne Schwierigkeit¹ aus, die Rasse *Berlin* zeigte erst nach Zugabe von Nährflüssigkeit zur ganzen eingetrockneten Kultur Leben, während 13 Jahre alte Konidien von der Rasse *Münster I* nicht mehr auswuchsen. Auch nach Übersichten mit Nährlösung zeigte diese Kultur kein Leben mehr; dagegen waren 11 Jahre alte Konidien keimfähig. Die Grenze der Keimfähigkeit bei der Rasse *Münster I* dürfte demnach um 12 Jahre liegen und die der Rasse *Berlin* einige Jahre höher.

Ähnlich wie *Asp. niger Berlin* verhielt sich auch *Asp. Ficum*, eine Art, die nach *Wehmer* sowie *Thom* und *Church* wahrscheinlich als eine Rasse von *Asp. niger* zu betrachten ist, auf jeden Fall aber zur *niger*-Gruppe gehört. 12 jährige Kulturen zeigten nur nach Zugabe von Nährflüssigkeit zur eingetrockneten Kultur Leben, während 10 jährige Konidien noch auskeimten; die obere Lebensgrenze dürfte demnach wenig über 12 Jahre liegen.

Von den 3 Mutanten des *Asp. niger* war nach 12 Jahren nur noch *Asp. niger altipes* lebend, während *Asp. cinnamomeus* und *Asp. fuscus*.

¹ Von Rasse *Göttingen alt* war der größte Teil der Konidien bereits abgestorben.

gestorben waren. Da 10 jährige Konidien von *Asp. fuscus* sich als unfähig erwiesen, muß die maximale Lebensdauer dieser Mutante v. der zur Verfügung stehenden Rasse um 11 Jahre liegen.

Gewisses Interesse beansprucht noch der Befund, daß, wie früher gegeben, mindestens 16 Jahre alte Aleppo-Gallen in steriler feuchter immer sich mit *Asp. niger* bedeckten. Nunmehr wurden über 20 Jahre verschlossenem Gefäß im hiesigen Museum aufbewahrte Aleppo-Gallen in eine feuchte Kammer gebracht, *Aspergillus*-Wachstum zeigte sich nicht.

Wie bei *Asp. flavus* war auch bei *Asp. niger* die Lebensdauer der einzelnen Rassen unterschiedlich, sie lag bei den benutzten erheblich über der bisher bekannten und besonders höher als die *Wehmer* und *abl* bei ihren Rassen gefunden hatten. Besondere Beachtung verdienen die 3 Mutanten *altipes*, *fuscus* und *cinnamomeus*, die aus einer gemeinsamen Einsporkultur entstanden waren¹. Wenn wir annehmen, daß die Ursprungsrasse, der *altipes* nach *Schiemann* näher steht als die beiden Farbmутanten, langlebig war, so hat sich das Erbgut, ein hohes Alter zu erreichen, bei *fuscus* und *cinnamomeus* ungünstig verändert und es läge auch in dieser Hinsicht *Verlustmutation* vor wie bezüglich der Fähigkeit zur Pigmentbildung.

Aspergillus Oryzae (Ahlburg) Cohn.

Nach den bisherigen Angaben in der Literatur können von allen *Aspergillus*-Arten die Koniden von *Asp. Oryzae* am längsten ihre Keimkraft behalten. *Mc Crea* berichtet nämlich, daß Konidien dieses Pilzes, die 22 Jahre in einem versiegelten Reagensglas aufbewahrt wurden, sich noch als keimfähig erwiesen. Nach *Wehmer* zeigten sich 2½-, 3- bis 4- und über 5 jährige Kulturen lebend. Der Autor hält die Koniden dieses Pilzes „jedenfalls mit zu den am längsten ihre Keimkraft bewahrenden Pilzsporen“. Bei mir hatten sich früher 2½ jährige Kulturen vermehrungsfähig erwiesen.

Leider stand jetzt kein älteres Kulturmaterial mehr zur Verfügung. Es wurden aber 6 verschiedene, um 45 Jahre alte Koji-Muster (5 Reis- und 1 Graupen-Koji) auf ihre Keimkraft untersucht; es konnte aus einem mehr *Asp. Oryzae* herausgezüchtet werden².

In Tabelle II wird eine Übersicht über die Lebensdauer verschiedener *Aspergillus*-Arten gegeben, wobei die bereits näher besprochenen Angaben teilweise mit aufgeführt werden.

¹ *Asp. cinnamomeus* ist auf einem mit Kaliumchromat versehenen Nährboden entstanden, die beiden anderen Mutanten traten mehrmals, teils nach Reizung mittels Chemikalien, teils spontan auf.

² Da dieser Pilz in Japan eine große Bedeutung in der Saké- und Soja-ohnenindustrie hat, ist anzunehmen, daß in der dortigen Literatur auch genauere Angaben über seine Lebens- bzw. Keimfähigkeitsdauer niedergelegt sind.

Tabelle II. Übersicht über die Lebensdauer verschiedener *Aspergillus*-Arten¹.

<i>Aspergillus</i> ²	Alter der Kultur in Jahren	Keimfähigkeit	Autor	Bemerkungen
<i>albus</i> Wilhelm	2 $\frac{1}{2}$	+	Zobl	
<i>amoenus</i> Roberg	5 u. 12	+	Roberg	
<i>aureoglauca</i> Roberg	5	+	Roberg	
<i>candidus</i> (Link?) Wehmer	1 $\frac{1}{2}$	+	Zobl	
	2 $\frac{1}{2}$	—	Wehmer	
	12	+	Roberg	
<i>cinnamomeus</i> Schieman.	12	—	Roberg	
<i>clavatus</i> Desmazières	2 $\frac{1}{2}$	+	Wehmer, Roberg, Zobl	Bei Wehmer nur nach Zugabe von Nährflüssigkeit zur Kultur.
	5	—	Siebenmann	
	12	—	Roberg	
<i>elegans</i> Gasperini	1 $\frac{1}{2}$	+	Zobl	
<i>Ficum</i> (Reich.) Hennings	10	+	Roberg	
	12	+	Roberg	Nur nach Zugabe von Nährflüssigkeit zur Kultur.
<i>Fischeri</i> Wehmer	1 $\frac{1}{2}$	+	Zobl	
	5 u. 10	+	Roberg	
	12	—	Roberg	
<i>flavipes</i> Bainier et Sartory	5	+	Roberg	
	12	—	Roberg	
<i>flavus</i> Link	5	+	Roberg, Siebenmann	
	6	+	Brefeld, Wehmer	
	8—9	+	Hansen, Wehmer	
	20	—	Wehmer	
Rasse Roberg	12	+	Roberg	
„ Baarn	12	+	Roberg	Nur nach Zugabe von Nährflüssigkeit zur Kultur.
„ Wehmer	12	—	Roberg	
<i>fumigatus</i> Fresenius	2 $\frac{1}{2}$	+	Roberg, Zobl	
	6	—	Wehmer	
	10	+	Eidam	
	12	+	Roberg	
	15	+	Roberg	Nur nach Zugabe von Nährflüssigkeit zur Kultur.
<i>fuscus</i> Schieman.	10	+	Roberg	
	12	—	Roberg	
<i>giganteus</i> Wehmer	2 $\frac{1}{2}$	+	Wehmer	
<i>glaucus</i> Link	1—2	—	Wehmer	
	5	+	Roberg	
	9	+	Blochwitz	
	16	+	Hansen	
Rasse III	12	+	Roberg	
„ I, II, III	15	+	Roberg	Ein beträchtlicher Teil der Konidien war abgestorben.
<i>malignus</i> Lindt	1 $\frac{1}{2}$	+	Zobl	
<i>minus</i> Wehmer	2 $\frac{1}{2}$	+	Wehmer	
<i>nidulans</i> Eidam	1 $\frac{1}{2}$	+	Eidam, Zobl	
	2 $\frac{1}{2}$	+	Roberg	
	12	+	Roberg	
<i>niger</i> van Tieghem	1	+	de Bary	
	3	—	Wehmer	Nur nach Zugabe von Nährflüssigkeit zur Kultur.
	5	+	Siebenmann, Brefeld	
	6	+	Hansen	
Rasse Zach	2 $\frac{1}{2}$	+	Zobl	
„ Zobl I u. II	1 $\frac{1}{2}$	+	Zobl	
	2 $\frac{1}{2}$	—	Zobl	

Tabelle II (Fortsetzung).

<i>Aspergillus</i>	Alter der Kultur in Jahren	Keimfähigkeit	Autor	Bemerkungen
Rasse <i>Berlin, Fulda, Göttingen alt, Göttingen neu Münster II und Zwetsche</i>	12	+	<i>Roberg</i>	R. <i>Berlin</i> nur nach Zugabe von Nährflüssigkeit zur Kultur; von R. <i>Göttingen</i> war ein großer Teil der Konidien bereits abgestorben.
„ <i>Münster I</i> . . .	11	+	<i>Roberg</i>	
„ <i>Münster I</i> . . .	13	—	<i>Roberg</i>	Es keimten nur noch wenige Konidien aus.
<i>niger altipes</i> Schieman . .	12	+	<i>Roberg</i>	
<i>ochraceus</i> Wilhelm . . .	9	+	<i>Blochwitz</i>	
<i>Oryzae</i> (Ahlburg) Cohn .	2 $\frac{1}{2}$	+	<i>Roberg, Wehmer</i>	
	5	+	<i>Wehmer</i>	
	22	+	<i>Mc Crea</i>	
<i>Penicillopsis</i> (Hennings) Raciborski	2 $\frac{1}{2}$	+	<i>Wehmer</i>	Nur nach Zugabe von Nährflüssigkeit zur Kultur.
<i>terricola</i> Marchal	2 $\frac{1}{2}$	+	<i>Zobl</i>	
<i>varians</i> Wehmer	1—2	+	<i>Wehmer</i>	
	2—3	—	<i>Wehmer</i>	
<i>versicolor</i> (Vuillemin) Tiraboschi	9	+	<i>Blochwitz</i>	
<i>Wentii</i> Wehmer	2 $\frac{1}{2}$	+	<i>Wehmer, Zobl</i>	

¹ Wahrscheinlich stehen in der Literatur, zum Teil an versteckter Stelle, noch andere Angaben, da Beobachtungen vorliegender Art häufig nur nebenbei mitgeteilt werden. Arbeiten von *Lucet* und von *Renon*, in denen nach *Lode* Angaben über die Lebensdauer von *Aspergillus*-Konidien enthalten sind, konnten nicht eingesehen werden. — ² Die einzelnen Arten werden unter den Namen aufgeführt, welche die Autoren wählten, obwohl es sich wahrscheinlich verschiedentlich um Synonyme handelt. Es sei dieserhalb auf *Thom* und *Church* verwiesen.

Schlußbetrachtungen.

Wehmer betonte seinerzeit, daß die Lebensdauer einer *Aspergillus*-Kultur bzw. derer Konidien abhängig sei von der Art der jeweilig vorliegenden Rasse, der Aufbewahrung und dem Nährboden. Ob und wie weit sich die Aufbewahrungsart und das Nährmedium auswirken, kann aus unseren Beobachtungen nicht geschlossen werden, doch möchte ich annehmen, daß bei einer ausgetrockneten Kultur die Art des Kulturbodens eventuell einen Einfluß auf die Lebensdauer des Mycels ausüben kann, kaum dagegen die Keimkraft der Konidien beeinflusst, es sei denn insofern, als das Nährsubstrat die Ausbildung gesunder Konidien nicht gestattet hat. Deren Keimfähigkeitsdauer hängt meines Erachtens dagegen in erster Linie, abgesehen von der Art, von der gerade vorliegenden Rasse ab; wie bei allen Lebewesen wird die maximale Lebensdauer auch bei den *Aspergillus*-Arten eine in den Rassen selbst liegende Eigenschaft, eine *Rasseneigentümlichkeit*

sein. Dies geht aus den Angaben in der Literatur und den eigenen Versuchen bei *Asp. flavus*, *glaucus* und *niger* hervor. Jedoch sterben, wie die Versuche mit *Asp. glaucus* und *niger* gezeigt haben, innerhalb einer Kultur, auch einer Einsporkultur, die Konidien nicht gleichmäßig ab, sondern nach und nach, worauf *de Bary* bereits aufmerksam gemacht hat.

Im großen und ganzen gesehen können *Aspergillus*-Kulturen ein höheres Alter erreichen, als man meist anzunehmen gewohnt war, zumal die früheren Angaben von *Eidam* über die Keimkraft von *Asp. fumigatus* nach 10 Jahren und von *Hansen* über das Auskeimen einer 16 Jahre alten Kultur von *Asp. glaucus* in Zweifel gezogen wurden. Beide konnten jetzt bestätigt werden.

Es zeigte sich aber, daß in Übereinstimmung mit Angaben in der Literatur die Konidien der alten Kulturen eine längere Zeit zum Auskeimen auf frischen Nährmedien benötigten als die jungen Kulturen. In weiteren Versuchen soll diesem Unterschied in der Keimzeit junger und alter Konidien nachgegangen werden.

Zusammenfassung.

10 bis 15 Jahre alte, eingetrocknete Kulturen von 14 *Aspergillus*-Arten, die in insgesamt 24 Rassen vorlagen, wurden auf ihren Lebenszustand untersucht. Durch Abimpfung konnten von 11 Arten neue Kulturen angelegt werden, während sich nur 3 als abgestorben erwiesen. Die verschiedenen Rassen einer Art verhielten sich häufig unterschiedlich.

Die maximale Lebensdauer vieler *Aspergillus*-Arten ist höher als man bisher meist annahm; sie hängt allerdings entscheidend von der vorliegenden Rasse ab, da die Fähigkeit, ein hohes Alter zu erreichen, neben einer Art- in erster Linie eine Rasseneigentümlichkeit darstellen dürfte.

Versuch mit einigen *Penicillium*-Arten.

Anhangsweise sei noch über einen Versuch über die Lebensdauer von drei *Penicillium*-Arten berichtet, ohne auf die diesbezügliche Literatur einzugehen. Reinkulturen folgender Arten erwiesen sich nach 12 Jahren als abgestorben:

<i>Penicillium brevicaulis</i>	Saccardo,
„	<i>luteum</i> Zukal und
„	<i>Camemberti</i> , d. h. ein aus Original Camembert-Käse gezogener, grüner Pinselschimmel.

Literatur.

Bary, A. de, Vergleichende Morphologie und Biologie der Pilze, S. 373. Leipzig 1884. — *Behr, G.*, diese Zeitschr. 1, 418, 1930. — *Blochwitz, A.*, Ber. d. deutsch. bot. Ges. 41, 205, 1923. — *Brefeld, O.*, Bot. Unters. über Schimmel-

pilze. Heft II, S. 76, Leipzig 1874; Heft III, S. 66, Leipzig 1877. — *Eidam, E.*,
 Beitr. Biol. d. Pfl. **3**, 397, 1883. — *Frey, A.*, u. *H. Poschenrieder*, diese Zeit-
 schrift **3**, 409, 1932. — *Hansen, E. Chr.*, Bot. Zeitung, **55**, 1. Abt., S. 127, Anm.,
 1897. — *Lode, A.*, Arch. f. Hyg. **42**, 107, 1902. — *Mc Crea, A.*, Science (N. Y.),
 N. S., **58**, 426, 1923. — *Paley, T.*, diese Zeitschr. **7**, 206, 1936. — *Rippel, A.*,
 u. *P. H. Kreutzmann*, diese Zeitschr. **6**, 276, 1935. — *Roberg, M.*, Centralbl. f.
 Bakt. II, **84**, 218, 1931. — *Schwartz, W.*, u. *H. Lang*, diese Zeitschr. **5**, 387,
 1934. — *Siebenmann, F.*, Die Schimmelmikosen des menschlichen Ohres,
 S. 26. Wiesbaden 1889. — *Thom, Ch.*, u. *M. B. Church*, *The Aspergilli*. London
 u. Baltimore, 1926. — *Wehmer, C.*, Die Pilzgattung *Aspergillus*. Mem. d.
 l. Soc. Phys. de Genève **33**, 2. Teil, Nr. 4, 1901. — *Derselbe*, Ber. d. Deutsch.
 bot. Ges. **22**, 476, 1904. — *Derselbe*, Centralbl. f. Bakt. II, **3**, 104, 1897. —
Zobl, K. H., diese Zeitschr. **13**, 14, 1943.

(Aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen.)

Untersuchungen an Proactinomyceten.

Von

O. v. Plotho.

Mit 1 Tafel.

(Eingegangen am 1. Juli 1944.)

Die *Proactinomyceten* bilden eine nach kulturellen, morphologischen und physiologischen Eigentümlichkeiten wohl abzugrenzende Gattung in der Familie der *Actinomyceten*. Als selbständige Gruppe wurden sie jedoch erst sehr spät erkannt.

In der Literatur finden sich unter den mannigfachsten Bezeichnungen mehr oder weniger eingehend Stämme beschrieben, die zweifellos in die Gattung *Proactinomyces* zu stellen sind. Besonders häufig trifft man schon frühzeitig in der medizinischen Literatur auf die Beschreibung von Organismen, deren Bau und Entwicklungsgeschichte einerseits an *Actinomyceten*, andererseits an *Bakterien* und *Kokken* erinnert: Es isolierten und beschrieben Nocard 1888 *Bacillus du farcin de boeuf* aus eitrigen Geschwüren des Rindes; Gruber wenig später *Micromyces Hoffmanni*; Eppinger 1891 *Cladothrix asteroides*, eine anfangs verzweigte, kurze Fäden, später Stäbchen und Kokken bildende Form aus einem Gehirnabszeß des Menschen; Wolf und Israel *Actinomyces hominis* aus menschlichen Actinomykoseknoten; Vallée aus dem Blut eines erkrankten Pferdes einen kurzfädigen, in kurze Teilstücke zerfallenden, rötlich gefärbten Organismus; Haas 1906 aus Actinomykoseknoten des Menschen zwei Stämme, für die er die Bezeichnung *Actinobacterium* vorschlug. Ähnliche Organismen beschrieben Caminiti, Lignières, Spitz, Namyslowsky und Henrici und Gardner.

Als Saprophyten sind ebenfalls nicht allzu selten ähnliche Organismen beschrieben. Beijerinck und van Delden isolierten aus der Luft sehr kleine und dünne Kurzstäbchen, deren Länge „sehr variabel“ war. Störmer fand im Erdboden Formen, die Toluol, Phenol und m-Kresol als Kohlenstoffquelle zu benutzen vermochten. Unter Lieskes „kurzfädigen Formen“ sind manche bei den *Proactinomyceten* einzureihen, z. B. der in der Abb. 18 auf S. 52 angeführte Stamm, ebenso wie zwei auf S. 201 abgebildete Organismen. Söhngen, Dooren de Jong, Gray und Thornton sowie Wittern beschrieben als *Mycobakterien* Formen, die nach neueren Untersuchungen zu den *Proactinomyceten* zu stellen sind. Bokor bezeichnete seinen Organismus als *Mycococcus cytophagus*, eine Form, die nach Bau und Entwicklung einen *Proactinomyceten* darstellt. Novak und Mitarbeiter teilten 1933 Untersuchungen über verschiedene stark polymorphe Organismen mit, die „zwischen *Staphylococci* und *Actinomyceten*“ stehen, und Colein beschrieb noch 1935 die Verwandlung eines gelben „*Micrococcus*“ in stäbchen- und fadenförmige Individuen, nachdem Jensen bereits 1931 und 1932 eingehende Untersuchungen

veröffentlicht und die Gattungsbezeichnung *Proactinomyces* vorgeschlagen hatte. Sie ist ohne Frage die glücklichste von allen und wird sich, soweit das heute übersehbar ist, restlos durchsetzen.

Trotz allen Einzelbeschreibungen bestehen im übrigen aber über den Bau der *Proactinomyceten*, ihre physiologischen Merkmale, ihre Vermehrung usw. wenig eingehendere Untersuchungen. Außer den Arbeiten von *Jensen* liegt nur eine ausführliche neuere Arbeit des russischen Forschers *Krassilnikov* vor, der, wie es in der englischen Zusammenfassung heißt, 300 Kulturen aus verschiedenen Böden und geographischen Zonen der Sowjetunion isolierte und eine ausführliche Beschreibung einzelner Typen gab sowie ihre systematische Gliederung durchführte. Leider finden sich in der Arbeit nur schematische Zeichnungen und keine photographischen Wiedergaben. Ganz kürzlich erschien dann eine Arbeit von *J. v. Horvath*, der „bei der Suche nach einem pyridinzersetzenden Mikroorganismus“ einen *Proactinomyceten* aus Gartenerde isolierte, den er nach verschiedenen Gesichtspunkten hin beschreibt (*Proactinomyces roseus*).

In den nachfolgenden Ausführungen werden die Ergebnisse der Untersuchungen mitgeteilt, die an 25 verschiedenen *Proactinomyceten*-Stämmen durchgeführt wurden, die sämtlich aus Böden der näheren und weiteren Umgebung Göttingens isoliert worden waren.

Isolierungsmethode, Herkunft und allgemeine Charakterisierung der einzelnen Stämme.

Isolierung der Proactinomyceten. Ich benutzte eine schon von *Ehrlich* verwendete und von *Bucherer* und von *Horvath* etwas veränderte Nährlösung folgender Zusammensetzung: KH_2PO_4 0,2%, MgSO_4 0,06%, FeSO_4 0,005%. Diese Grundlösung wurde im Autoklaven bei 1,5 Atm. Druck sterilisiert und danach wurden als einzige Kohlenstoff- und Stickstoffquelle je 0,2% Nicotin, Pyridin, Piperidin und Anilin zugesetzt, von denen die drei erstgenannten heterozyclische Verbindungen darstellen, dann die einzelnen Kolben mit Erdproben verschiedener Herkunft beimpft und mehrere Tage bei 25–27° C gehalten. Es entwickelten sich in der überwiegenden Mehrzahl *Proactinomyceten*, bei deren Reinkultur es sich erwies, daß die meisten von ihnen, jedoch nicht alle, die Fähigkeit besaßen, die betreffende Kohlenstoff-Stickstoff-Verbindung zu zersetzen. Außer mit Erdproben wurde auch eine größere Anzahl von Versuchskolben mit Teichwasser verschiedener Reinheit und Gegend beimpft. Es war jedoch in keinem Falle möglich, aus ihnen *Proactinomyceten* zu isolieren, so daß es nicht unwahrscheinlich ist, daß sie sich in unseren Gegenden im Wasser nicht finden. *Krassilnikov* gibt jedoch an, daß er eine Reihe von Stämmen im Wolgawasser nachweisen konnte.

Makroskopisches Bild, Entwicklungszyklus und Herkunft der Stämme sind in Tabelle I aufgezeichnet.

Benennung der Stämme: Bei den Stämmen, die eine bestimmte C–N-Verbindung anzugreifen vermögen — und zwar nur diese — beziehe ich diese Fähigkeit in ihren Namen ein und füge zur Unterscheidung verschiedenartiger Stämme mit der gleichen Fähigkeit ihrem Namen eine römische Ziffer bei. Die Benennung der übrigen Stämme ist die von *Krassilnikov* vorgeschlagene. Er zieht zur Klassifizierung der *Proactinomyceten* ihre Färbung heran, die bei diesen Organismen oft in enger Beziehung steht zu ihren morphologischen und physiologischen Eigenschaften, wobei jedoch zu be-

Tabelle I. Alter der Kulturen in der dritten Vertikalreihe 18 Tage. Anfangs-pH 6,8. Temperatur 25—27° C.

Nr. des Stammes	Name des Stammes	Farbe des Stammes	Beschaffenheit der Kultur auf Dextrose-Agar ¹	Endzustand, 4 Wochen nach der Impfung	Herkunft
1	<i>Proactinomyces ruber</i> Krass.	hochrot	halbflecht, weich, matt, konvex, Kolonierand verästelt	ungleich lange Stäbchen und Kokken	Walderde
2	<i>Pr. ruber</i> Krass.	rot	trocken, weich, matt konvex, Kolonierand verästelt	Kurzstäbchen und Kokken	Walderde
3	<i>Pr. ruber</i> Krass.	rot	sehr feucht, glänzend, glatt, flach	große Kokken	Walderde
4	<i>Pr. ruber</i> Krass.	hochrot	trocken, weich, matt, Kolonierand verästelt	Kurzstäbchen und Kokken	Ackererde
5	<i>Pr. ruber</i> Krass.	orangefarben	sehr feucht, glänzend, flach, rund	Kurzstäbchen u. Kokken	Ackererde
6	<i>Pr. ruber</i> Krass.	schwachrötlich	sehr feucht, glänzend, flach	Kokken	faulendes Holz
7	<i>Pr. pyridinus</i> <i>I n. sp.</i>	schwachrötlich	trocken, matt, gefaltet	Kurzstäbchen	faulendes Holz
8	<i>II n. sp.</i>	gelbrot	trocken, matt, gefaltet	Kurzstäbchen	Walderde
9	<i>III n. sp.</i>	rötlich	grobe Faltung, trocken, matt	Kokken u. Kurzstäbchen	Komposterde
10	<i>IV n. sp.</i>	orangefarben	feingefaltet, halbtrocken, wachsartig	ungleich lange Stäbchen und Kokken	Komposterde
11	<i>Pr. piperidinus</i> <i>I n. sp.</i>	schwachrötlich	halbflecht, glänzend, Kolonierand verästelt, konvex	Kurzstäbchen u. Kokken	Komposterde
12	<i>II n. sp.</i>	rosa	trocken, brüchig, grobe Faltung, matt	ungleich lange Stäbchen und Kokken	Walderde
13	<i>III n. sp.</i>	gelbrosa	trocken, feine Faltung, matt	ungleich lange Stäbchen und Kokken	Walderde

Nr. des Stammes	Name des Stammes	Farbe des Stammes	Beschaffenheit der Kultur auf Dextrose-Agar ¹	Endzustand, 4 Wochen nach der Impfung	Herkunft
14	<i>Pr. anilinus</i> I n. sp.	rosa	glänzend, schleimig, Kolonierand verästelt	Kokken	Komposterde
15	II n. sp.	rot	matt, trocken, schwache Faltung	Kurzstäbchen	Komposterde
16	<i>Pr. flavus</i> Krass.	goldgelb	halbflecht, glatt, glänzend	Kurzstäbchen	Gartenerde
17	<i>Pr. flavus</i> Krass.	gelbgrün	halbtrocken, glatt, glänzend, Kolonierand rund	Kurzstäbchen	Komposterde
18	<i>Pr. citreus</i> Krass.	braungrün	halbtrocken, leicht gefaltet	Stäbchen u. Dauerformen	Komposterde
19	<i>Pr. citreus</i> Krass.	gelbgrün	flecht, glatt, glänzend, Kolonie rund	Stäbchen u. Dauerformen	faulendes Holz
20	<i>Pr. nicotinus</i>	braungrün	flecht, glatt, glänzend, Kolonie rund	Stäbchen u. Dauerformen	Gartenerde
21	I n. sp.	gelbgrün	halbflecht, matt	Stäbchen u. Dauerformen	Komposterde
22	II n. sp.	gelbgrün	halbflecht, matt	Stäbchen u. Dauerformen	Komposterde
23	III n. sp.	gelbgrün	halbflecht, matt	Stäbchen u. Dauerformen	Komposterde
24	IV n. sp.	gelbgrün	flecht, Kolonie rund, glänzend	Stäbchen u. Dauerformen	Komposterde
25	V n. sp.	gelbgrün	flecht, Kolonie rund, glänzend	Stäbchen u. Dauerformen	Komposterde
	VI n. sp.	gelbgrün		Stäbchen, sehr kleine Dauerformen	Komposterde

¹ Dextroseagar: Dextrose 10%, Pepton-Witte 1,20%, Liebig's Fleischextrakt 0,60%, NaCl 0,20%.

In der Tabelle finden sich: 4 Stämme, die Pyridin zersetzen; 3 Stämme, die Piperidin zersetzen; 2 Stämme, die Anilin zersetzen; 6 Stämme, die Nicotin zersetzen; 10 Stämme ohne Fähigkeit zur Zersetzung einer bestimmten C—N-Verbindung.

achten ist, daß eine Farbbezeichnung, wie z. B. „ruber“, nicht nur auf einen Farbton, etwa hochrot, angewendet wird, sondern daß sie alle Stämme mit orangefarbenen bis zu dunkelroten Pigmentierungen zu einer Gruppe zusammenfaßt. Die *pyridinus*-, *piperidinus*- und *anilinus*-Stämme der Tabelle I fallen in die Skala dieser Farbtöne und stehen deshalb in der Gruppe der orangefarbenen bis dunkelroten Stämme, mit denen sie manche Eigenschaften gemeinsam haben, von denen sie sich aber auch, außer durch ihre besondere Fähigkeit zur Zersetzung, in mancher Beziehung unterscheiden. Die Gruppe *Pr. citreus* umfaßt die gelb- bis braungrünen Stämme. Solche Farbtöne besitzen auch die *nicotinus*-Stämme, sie wurden daher bei dieser Gruppe eingereiht. Für ihre verwandtschaftlichen Beziehungen zu ihr gilt das für die gelbroten Formen Gesagte. Was unter der Bezeichnung „Dauerform“ zu verstehen ist, wird später ausführlich erörtert werden. Die Stämme mit der gekennzeichneten besonderen Fähigkeit der Zersetzung werden der Kürze halber im folgenden, wenn sie nicht einzeln benannt werden, als „Giftzersetzer“ bezeichnet, obgleich diese Bezeichnung natürlich anfechtbar ist, denn „Gift“ ist kein fest umschriebener, allgemein gültiger Begriff. Über diese wichtige und außergewöhnliche Fähigkeit bestimmter *Proactinomyces* wird in einer besonderen Arbeit berichtet werden. Hier sollen in erster Linie ihre kulturellen, morphologischen und sonstigen physiologischen Eigenschaften besprochen werden, die auch manche interessante und ihnen eigentümliche Besonderheiten erkennen lassen.

Entwicklungszyklus der Proactinomyces. In der Literatur finden sich überwiegend gleichlautende Angaben, daß das mehr oder weniger ausgebildete Jugendmycel in Stäbchen zerfalle, die sich weiter teilen und verkürzen, so daß im Endzustand kokkenförmige Gebilde vorhanden seien. Nur vereinzelt stößt man auf die Beschreibung eines anderen Endzustandes. So gibt *Jensen* bei seinem *Pr. minimus* für alte Kulturen Kurzstäbchen und Kokken an, für *Pr. polychromogenes* sogar nur Stäbchen „von 4 bis 10 μ “. Die Beschreibung des Endzustandes als kokkenförmig trifft aber, wie die Tabelle I erkennen läßt, durchaus nicht auf alle Stämme zu. Es finden sich unter den untersuchten nur 4, auf die sie voll bezogen werden kann, 9 weisen neben Kokken auch Stäbchen auf, die zum Teil als Kurzstäbchen erscheinen, zum Teil aber die Länge mehrerer Mikron erreichen. Bei nicht weniger als 12 Stämmen lagen in den 4 Wochen alten Kulturen nur Stäbchen vor, die sich auch nach sechswöchiger Kulturdauer nicht in Kokken verwandelt hatten. Es hat den Anschein, als ob die meisten Angaben in der Literatur in dieser Beziehung etwas summarisch seien. Auch *v. Horvath* gibt z. B. für den von ihm beschriebenen Organismus das Kokkenstadium als Endzustand an. Die Abb. 2, die ausdrücklich als solches Stadium bezeichnet wird, läßt aber fast keine Kokken, sondern überwiegend Stäbchen erkennen. In flüssigem Substrat kommen kokkenartige Formen noch seltener vor als auf festem, die Kulturen enthalten entweder überhaupt keine oder nur in beschränkter Menge.

Bei sorgfältiger Prüfung dieser Verhältnisse gewinnt man jedoch den Eindruck, daß auf unseren künstlichen Medien bei längerer Kulturdauer die Fähigkeit des Stäbchenzerfalls in Kokken beeinträchtigt würde. Unter den untersuchten Organismen bildete z. B. Stamm 21



Abb. 1

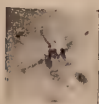


Abb. 2



Abb. 3

Abb. 1. Einzell-Kultur von *Stamm 1 (ruber)*, Beginn der Entwicklung. Vergr. 930.

Abb. 2. Einzell-Kultur von *Stamm 1 (ruber)*, Fortschreiten der Entwicklung. Vergr. 930.

Abb. 3. Einzell-Kultur von *Stamm 1 (ruber)*, 24 Stunden alt. Vergr. 930.



Abb. 4



Abb. 5

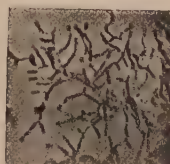


Abb. 6

Abb. 4. Einzell-Kultur von *Stamm 7 (pyridinus)*, 36 Stunden alt. Vergr. 600.

Abb. 5. Einzell-Kultur von *Stamm 9 (pyridinus)*, 3 Tage alt. Vergr. 930.

Abb. 6. Einzell-Kultur von *Stamm 12 (piperidinus)*, 24 Stunden alt. Vergr. 550.



Abb. 7



Abb. 8

Abb. 7. Einzell-Kultur von *Stamm 12 (piperidinus)*, 36 Stunden alt. Vergr. 600.

Abb. 8. Einzell-Kultur von *Stamm 17 (flavus)*, 30 Stunden alt. Vergr. 600.



Abb. 9

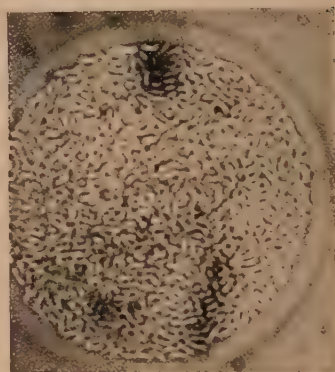


Abb. 11

Abb. 9. Einzell-Kultur von Stamm 19 (*citreus*), 24 Stunden alt. Vergr. 500.

Abb. 10. Einzell-Kultur von Stamm 20 (*nicotinus*), wenige Stunden alt. Vergr. 930.



Abb. 10

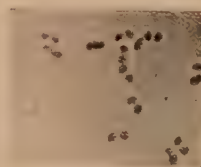


Abb. 12

Abb. 11. Einzell-Kultur von Stamm 20 (*nicotinus*), wenige Stunden alt. Vergr. 930.

Abb. 12. Kokkenförmiges Endstadium von Stamm 21 (*nicotinus II*), 7 Tage alt. Vergr. 1250.

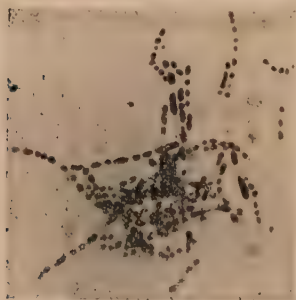


Abb. 13



Abb. 14

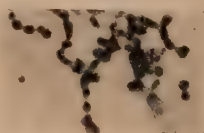


Abb. 15

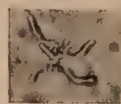


Abb. 16

Abb. 13. Entstehung des Endstadiums. Stamm 3 (*ruber*); Methylenblaufärbung nach Hydrolyse. Vergr. 1250.

Abb. 14. Knospung bei Stamm 18 (*citreus*). Vergr. 1550.

Abb. 15. Entstehung der Dauerformen Stamm 22 (*nicotinus III*). Methylenblaufärbung nach Hydrolyse. Vergr. 1250.

Abb. 16. Auskeimen der Dauerformen von Stamm 22 (*nicotinus III*). Vergr. 600.

kurz nach der Isolierung in alten Kulturen nur Kokken, während sich später, wie auch in der Tabelle vermerkt, in ihnen immer außerdem viele Stäbchen fanden. Es ist daher nicht ausgeschlossen, daß die in der Tabelle I wiedergegebenen Verhältnisse nicht die natürlichen sind, und daß im natürlichen Medium der Zerfall in Kokken die Regel ist und sehr viel schneller vor sich geht. Die *Proactinomyceten* nehmen zweifellos einen hohen Prozentsatz der Mikroflora des Bodens ein, und möglicherweise gehört eine ansehnliche Zahl der in Bodenproben als Kokken registrierten Formen in Wirklichkeit zu den *Proactinomyceten*.

Farbstoffbildung. In unseren Gegenden kommen, wie die Tabelle I beweist, Stämme mit gelbroter bis hochroter Färbung am häufigsten vor. Auch der durch *von Horvath* isolierte Organismus wuchs auf zusagendem Medium mit blaßroter Farbe. Weniger verbreitet sind Stämme mit gelb- bis braungrünen Kolonien und verhältnismäßig selten gelb gefärbte. Farblose und grüne Formen wurden nicht gefunden. Die Färbung ist bei *Proactinomyceten* ein sehr charakteristisches und konstantes Merkmal. Gefördert wird sie auf organischen Nährböden durch Dextrose und Glycerin, auf Trypsin-Pepton (aus Stierhoden, Firma *Grübler*) ist sie verwaschener und undeutlicher. Auf synthetischen Nährböden erscheint sie oft besonders rein und ist auf ihnen im allgemeinen besser entwickelt als auf komplexen, organischen. Fast überall finden sich die Pigmente aber nur als Eigenfarbe. Nur *Stamm 21* bildet auf allen Substraten einen braunen Farbstoff, der immer in den Nährboden übertritt. Im Licht (Tageslicht) tritt die Pigmentbildung früher auf als im Dunkeln, und belichtete Kulturen sind in der Regel intensiver gefärbt. Ein ähnliches Ergebnis wurde in zahlreichen Beobachtungen an anderen Mikroorganismen festgestellt (*Ebeling, Barbutieri*).

Über die Natur der Farbstoffe von *Proactinomyceten* sind keine Untersuchungen bekannt, doch liegen für ihre nächsten Verwandten Arbeiten russischer Forscher vor. *Kriss* untersuchte eingehend die Pigmente der *Actinomyceten*. *Kriss* und *Koroniako* beschäftigten sich ausführlich mit denen der *Mycobakterien* und konnten mit Hilfe der Absorptionsanalyse bei der Gruppe der roten bis orangefarbenen Pigmente, die in Wasser unlöslich, in Alkohol und anderen organischen Lösungsmitteln aber löslich sind, für verschiedene Stämme Carotinoide nachweisen.

Diese von *Brockmann* weiter entwickelte Methode (Aluminiumoxyd mit standardisiertem Adsorptionsvermögen) benutzte ich für die Untersuchung der hier besprochenen *Stämme 1, 3 und 4*, die die kräftigsten Färbungen aufwiesen. Die Farbstoffe der drei Stämme sind unlöslich in Wasser, können aber leicht mit Methylalkohol extrahiert werden. Der Farbstoff von *Stamm 1* geht mit rein gelber, der von *Stamm 3* und *4* mit roter Farbe in das Lösungsmittel. Da aber aus der Methanollösung eine Adsorption an Aluminiumoxyd nicht zu erreichen ist, müssen die Farbstoffe in geeignete Lösungen überführt werden. Als eine solche erwies sich eine Mischung von Benzol und Petroläther im Verhältnis 1:4, in die die Farbstoffe aber erst nach starker Verdünnung mit Wasser übertraten (Beschreibung bei *Willstaedt*). Das Chromatogramm von *Stamm 1* zeigte eine gelbe und eine darunterliegende schmale

orangefarbene Zone, dasjenige von *Stamm* 3 und 4 eine gelbrote Zone. Alle drei Stämme enthalten Carotin.

Zur Erhärtung dieses Ergebnisses wurde der Farbstoff auch nach der von *Molisch* angegebenen Methode auf Carotin geprüft. Es bildeten sich bei *Stamm* 3 braungelbe Kristalle, teils in einzelnen Nadeln, teils in sternförmigen oder unregelmäßig gelagerten Aggregaten. Bei *Stamm* 1 und 4 zeigten sich zahlreiche gelbe Tröpfchen, die zum Teil zu großen tiefgelben unregelmäßig umgrenzten Anhäufungen zusammengelaufen waren. Nachdem die Kalilauge mit destilliertem Wasser gut ausgewaschen und das Wasser im Exsikkator entzogen worden war, ergab sich mit konzentrierter Schwefelsäure Blaufärbung, die auf Zusatz von Wasser verschwand.

Wie erwähnt, scheidet *Pr. nicotinus* II n. sp. einen braunen Farbstoff in den Nährboden ab. Zur näheren Orientierung diene eine Kulturflüssigkeit, die sich bei Vorversuchen als für die Entwicklung des Farbstoffs vorteilhaft erwiesen hatte: Glycerin 2%, Tyrosin 0,1%, K_2HPO_4 0,1%, $MgSO_4$ 0,05%, NaCl 0,05%. Die Reaktion wurde auf p_H 8 eingestellt. Nachdem die Lösung 6 Wochen bewachsen war und eine Zunahme der Farbtintensität nicht mehr festgestellt werden konnte, wurde sie organismenfrei filtriert und mit einer Reihe von Lösungsmitteln kräftig ausgeschüttelt. Der Farbstoff ist unlöslich in Äther, Benzol, Toluol, Xylol, Tetrachlorkohlenstoff und Schwefelkohlenstoff. Beim Ausschütteln mit Chloroform tritt in das Lösungsmittel ein blaugrauer Farbstoff über, und die wässrige Lösung wird aufgeheilt, jedoch nicht vollständig entfärbt. Versetzt man sie vorsichtig mit Salzsäure, so erfolgt keinerlei Ausflockung, wie das bei manchen Kulturen von *Actinomyces*-Stämmen nach der gleichen Behandlung beobachtet wurde (v. Plotho, 1940). Die in Chloroform gelöste Komponente des Farbstoffs ist nicht einheitlich. Wird auf dem Wasserbad vorsichtig eingedampft, so erweist sich der blaue Farbstoff als nicht hitzebeständig, die Farbe verschwindet und es fallen bräunliche, nadelförmige Kristalle aus. Der Verdampfungsrückstand ist mit hellbrauner Farbe in Wasser löslich. Wird die Lösung angesäuert, so verändert sich die Farbe nicht, wird sie mit Alkali versetzt, so wird der braune Farbton vertieft, ein Farbumschlag findet nicht statt.

Von durch *Proactinomyces* gebildeten Farbstoffen, die in das Nährsubstrat diffundieren, ist in der Literatur nur ein einziger bekannt. Er wurde von einem Organismus gebildet, der von *Beijerinck* unter dem Namen *Actinococcus cyaneus* beschrieben wurde. Nach Morphologie und Entwicklungszyklus lag hier ein typischer *Proactinomyces* vor. Der Farbstoff war von dunkelblauer Farbe, löslich in Wasser und organischen Lösungsmitteln und vom Anthocyanotyp.

Es liegt nahe, diese in das Substrat diffundierenden Farbstoffe mit den zahlreichen Substratfarbstoffen zu vergleichen, die von *Actinomyces* gebildet werden und aus deren Eigenschaften auf die Bedeutung geschlossen werden kann, die diesen Organismen bei der Humusbildung zukommt. Beide Substratfarbstoffe der *Proactinomyces* sind aber offenbar denen der *Actinomyces* nicht verwandt, humusartige Verbindungen wurden nicht nachgewiesen.

Verhalten zum Sauerstoff. Zur Prüfung des Verhaltens der Organismen unter anaeroben Bedingungen wurde ein luftdicht abgeschlossenes Kulturgefäß mit den beimpften Versuchsröhrchen an der Wasserstrahlpumpe so weit evakuiert, daß es schließlich nur noch einen Sauerstoffpartialdruck von ungefähr 1 mm enthielt. Unter diesen Bedingungen zeigten bei einer Kulturtemperatur von 25° C und einem p_H des Nährbodens von 6,8 nach einer Kulturdauer von 18 Tagen nur die *Stämme* 3, 12 und 21 ein schwaches Wachstum. Es sind ausnahmslos solche Organismen, die unter allen anderen Verhältnissen eine besonders kräftige Entwicklung zeigten. Bei keinem war unter den anaeroben Bedingungen auch nur die geringste Farbstoffentwicklung eingetreten. Zur nochmaligen Prüfung dieses Ergebnisses wurden die 3 Stämme noch einmal unter den gleichen Bedingungen kultiviert und außerdem der Prüfung nach dem *Wright-Burri*-Verfahren unterworfen. Das Ergebnis war das gleiche. Demnach dürfen die *Proactinomyceten* allgemein als streng aerobe Organismen bezeichnet werden, zu deren normaler Ausbildung jedenfalls die volle Sauerstoffspannung der atmosphärischen Luft notwendig ist.

Das Mycelwachstum der einzelnen Stämme.

Von allen Beobachtern wurde immer wieder der äußerst große Pleomorphismus der *Proactinomyceten* betont. Noch weit stärker als bei *Mycobakterien* ergibt jede, einer Kultur willkürlich entnommene Probe bei entsprechender Vergrößerung ein zunächst hilflos verwirrendes Bild. Längere und kürzere, oft bogenförmige und ungleichmäßig verdickte oder keulenförmige Stäbchen, ovale und kokkoide Formen und dazu verzweigte, ungleich lange Fäden sind oft im gleichen Präparat zu finden. Der ungeübte Untersucher wird stets den Eindruck bekommen, keine Reinkultur vor sich zu haben, und auch für den Geübten ist die Beurteilung nicht immer leicht. Die Herstellung reiner Kulturen ist bei den *Proactinomyceten* keineswegs einfach.

Häufig hatten hartnäckig an den verhältnismäßig großen Jugendformen winzige Bakterien vom *fluorescens*-Typ oder ähnliche, die auch mit dem Mikromanipulator nur schwer zu entfernen sind. Auch kommt es nicht selten vor, daß zwei verschiedene *Proactinomyceten*, deren mikroskopisches Bild kaum voneinander abweicht und deren Kulturen auf den gebräuchlichen Nährböden sich in Form und Farbe gleichen, schwer zu trennen sind. Meistens gelingt in einem solchen Falle die Trennung nur dadurch, daß Einzelkolonien auf synthetischen Nährböden verschiedene Form oder Färbung erkennen lassen. Als trennungsgeschwerend kommt auch das ungleich schnelle Wachstum der verschiedenen Arten in Frage, besonders bei den gelben Stämmen, die zum Teil ihre Färbung erst langsam entwickeln. Endlich können auch Art und Reichhaltigkeit des Nährbodens die Häufigkeit der Verzweigung, den Zerfall in kürzere Formen oder das Bild des Endzustandes der Kultur nicht unwesentlich beeinflussen. Unter diesen Verhältnissen ist es durchaus nicht verwunderlich, daß die *Proactinomyceten* erst so spät als einheitliche Gattung erkannt wurden.

Bei dieser Mannigfaltigkeit schien es völlig aussichtslos, aus Vielzellkulturen zu einer zweifelsfreien Beurteilung des Habitus und der Entwick-

lung einzelner Stämme oder gar zu einer sicheren Unterscheidung verschiedener Arten zu kommen. Die im folgenden mitgeteilten Ergebnisse gründen sich daher ausschließlich auf zahlreiche Beobachtungen an Einzell-Kulturen. Diese wurden teilweise mit Hilfe des Mikromanipulators hergestellt und zum anderen Teil erreicht durch Anwendung der von *Fortner* angegebenen Deckglaskulturmethode, die zur fortlaufenden Beobachtung einzeln liegender Zellen, auch bei Benutzung stärkster Vergrößerungen vortrefflich geeignet ist. Als Kultursubstrat wurde fast immer Trypsinagar¹ verwendet, weil die ersten Wachstumsstadien auf ihm am besten zur Entfaltung kamen. Die Temperatur betrug 23—25° C, das *ph* 6,8, der für *Proactinomyceten* optimale Bereich.

Ruber-Gruppe. Stamm 1 (ruber) liefert ein für die ganze Gruppe sehr charakteristisches Bild. Abb. 1 stellt zwei aus Kurzstäbchen entstandene Stäbchen dar, die sich in die Länge gestreckt haben und durch dieses Längerwerden auf neuem Substrat den Beginn der Bildung einer neuen Kultur anzeigen. Auch wenn die Ausgangsform kokkenartige Gestalt besitzt, erfolgt die Neubildung einer Kultur bei den Vertretern der Gruppe *ruber* dadurch, daß der kokkenförmige Organismus sich streckt und zu einem Stäbchen auswächst. Die Kokken bzw. Kurzstäbchen können als ruhende Zellen aufgefaßt werden. Sie vermögen sich auf dem alten Nährboden nicht weiter zu entwickeln, auf neuem Medium nehmen sie aber ihren normalen Wachstumsmodus wieder auf.

Abb. 2 zeigt den gleichen *Stamm 1* in einem älteren Stadium. An den einzelnen Stäbchen sind bereits Verzweigungen deutlich zu erkennen, es entsteht ein kleines zusammenhängendes Mycel, das in seinen verhältnismäßig langen Hyphen schon den Typus seiner Gruppe unverkennbar zum Ausdruck bringt.

Dieser Typus tritt in dem 24 Stunden alten größeren Mycel der Abb. 3 noch stärker hervor. Die einzelnen Hyphen haben sich beträchtlich in die Länge gestreckt und zeigen bereits die für den Stamm normale Breite von 1,5 bis 1,7 μ . Sie ist die größte, die von den untersuchten *Proactinomyceten* erreicht wurde. Die Fadenbreite ist bei allen Stämmen ziemlich konstant, während die Hyphenlänge überall in nicht unbeträchtlichen Grenzen wechselt; diese hängt ab von der Art und Konsistenz des Nährmediums und ist ganz allgemein sehr schwankend. Es erscheint daher nicht zweckmäßig, eine bestimmte Fadenlänge als Charakteristikum eines Stammes anzugeben. Es kann nur ganz allgemein von langen, mittellangen und kurzen Fäden gesprochen werden. *Stamm 1 (ruber)* besitzt ausgesprochen lange Fäden, die 80 bis 100 Mikron und mehr erreichen können.

Die Hyphen des Mycels der Abb. 3 zeigen die Neigung, in das Agar hineinzuwachsen, aber auch, sich als winzige Lufthyphen über die Agaroberfläche zu erheben. In Massenkulturen beobachtet man bei echten *Proactinomyceten* auf organischen und synthetischen Nährböden nie Lufthyphen, im Jugendmycel ist aber, wie die Abbildung deutlich erkennen läßt, die Neigung zu Lufthyphenbildung vorhanden.

¹ Trypsin-Pepton aus Stierhoden nach *Grübler* 1,2%, Dextrose 1%, Liebig's Fleischextrakt 0,6%, NaCl 0,2%, Agar 1,8%.

Sie tritt mit der gleichen Deutlichkeit auch auf Abb. 4 und weniger ausgeprägt, aber doch unverkennbar ebenfalls auf Abb. 6 hervor. Bei Einzell-Kulturen der Gruppen *flavus* und *citreus* dagegen wurde sie im gleichen Entwicklungsstadium und auch später niemals festgestellt. Die Neigung zur Anlage eines Luftmycels dürfte darauf hindeuten, daß die Gruppe *ruber* den *Actinomyceten* verhältnismäßig nahesteht. In Abb. 3 erinnert außerdem die Lagerung des Mycels stark an die ganz junger *Actinomyces*-Mycelien, wie sie *Lieskè* in der schematischen Zeichnung auf S. 62 wiedergibt. Sie ist ganz charakteristisch für die Gruppe *ruber*. Es kommen in ihr immer diese aufgelockerten, gleichsam weitmaschigen Jugendformen vor, bei denen die einzelnen Fäden und Teilstücke deutlich erkennbar sind.

Diesen ausgesprochen lockeren Wachstumsmodus der ersten Stadien zeigen ganz unverkennbar auch die „Giftzersetzer“ der Gruppe *ruber*. Abb. 4 stellt eine 36 Stunden alte Kultur von *Pr. pyridinus I* dar, die sich aus einem Kurzstäbchen entwickelt hat. Jedes einzelne Fadenstück des kleinen Mycels ist deutlich unterscheidbar, es treibt Hyphen in das Agar hinein, aber auch einige über die Oberfläche hinaus in die Luft. Die Verzweigung ist verhältnismäßig gering, aber deutlich vorhanden, die Fäden sind mittellang, ihre Breite beträgt 0,7 bis 0,8 μ .

Abb. 5 zeigt eine Kultur von *Pr. pyridinus III* in etwas weiter vorgeschrittenem Alter. Die Kultur ist in voller Entfaltung, einzelne Teile des Mycels beginnen sich zu trennen, größere und kleinere Komplexe bilden sich. Man erkennt deutlich die Verzweigung, manche Stäbchen zeigen auch Winkellagerung. Die Breite der Fäden beträgt 0,7 bis 0,9 μ . Das Bild ähnelt in Verzweigung und Lagerung der Stäbchen dem in der Arbeit von *v. Horvath* als Abb. 1 wiedergegebenen. Auch wichtige physiologische Merkmale stimmen mit dem durch *v. Horvath* isolierten Stamm überein, so daß dieser mit *Pr. pyridinus III* möglicherweise identisch sein könnte.

Abb. 6 gibt das Bild des Stammes 12, *Pr. piperidinus II*, 24 Stunden nach der Impfung. Das Mycel ist schon recht kräftig entwickelt, was aber kein Maß für die Schnelligkeit der Entwicklung des Stammes überhaupt darstellt. Zeitangaben über die Latenzzeit einer ruhenden Zelle bis zur Wiederaufnahme ihres Wachstums auf neuem Substrat oder Bestimmungen über die durchschnittliche Teilungszeit der ersten Stäbchen, wie sie für *Mycobakterien* veröffentlicht wurden (*Carter* und *Hastings*), können bei *Proactinomyceten* überhaupt nicht gemacht werden. Der Wiederbeginn des Wachstums und dieses selbst verlaufen hier viel unregelmäßiger. Auf der gleichen Deckglaskultur liegen oft in gleichzeitig geimpften Präparaten kaum verlängerte ruhende Zellen in der Nähe von solchen, die schon zu kleinen Mycelien herangewachsen sind. In Abb. 6 ist, wie bereits erwähnt, die Neigung zur Lufthyphenbildung weniger deutlich, sie ist aber erkennbar. Die aufgelockerte Lagerungsweise des Mycels tritt auch hier stark in die Erscheinung, die Verzweigung ist mannigfaltiger als bei den bisher besprochenen Stämmen. Der allgemeine Habitus des Stammes ähnelt am meisten dem des Stammes 9, was besonders aus der Abb. 7 hervorgeht, die ein

späteres Stadium von *Pr. piperidinus* II zeigt, bei dem sich die einzelnen Glieder vom Grundmycel abzulösen beginnen. Auch hier kommt die stärkere Verzweigung der Einzelglieder zum Ausdruck. Die Hyphenbreite beträgt 0,7 bis 0,9 μ , die Fäden sind mittellang.

Flavus-Gruppe. Bei der Betrachtung der Abb. 8, die einen Vertreter der Gruppe *flavus* darstellt, entsteht sofort von dem ganzen Wachstumsmodus des Organismus ein vollständig anderer Eindruck. Nichts mehr von der aufgelockerten Lagerungsweise der oben besprochenen Formen, nichts mehr von der relativen Selbständigkeit der einzelnen Stäbchen, die sich in ihrer Ausbreitungslust nicht sehr beschränken lassen. Hier drängen sich die Stäbchen eng zusammen, sie lagern sich dicht an- und übereinander, die ganze Kolonie formt ein fest zusammenhängendes Gebilde. Vom Rande her lösen sich bei fortschreitendem Wachstum büschelförmige, verzweigte Teilstücke ab, die ihren büschelförmigen Zusammenhang noch längere Zeit aufrecht erhalten und den Stamm ganz unverkennbar von anderen unterscheiden. Nach etwa 5 bis 7 Tagen zerfallen die Büschel, einzelne verzweigte Stäbchen erhalten sich noch eine Zeitlang in der Kultur, bis sie schließlich in Kurzstäbchen zerfallen, die den Endzustand der Entwicklung darstellen. Der Unterschied im Habitus dieses Ausgangsmycels gegenüber dem der oben besprochenen Formen ist so groß, daß es jedem Beobachter nicht zweifelhaft sein kann, es hier mit einer anderen Art der *Proactinomyceten* zu tun zu haben.

Citreus-Gruppe. Das Jugendmycel des Stammes 19, eines Vertreters der Gruppe *citreus* (Abb. 9), ähnelt dem der *flavus*-Formen, die Verzweigung der Stäbchen ist hier aber bedeutend geringer, und die Verzweigungen bleiben stets kurz, so daß nie eine büschelförmige Zusammenballung entstehen kann. Die Stäbchen lösen sich einzeln aus dem Verband, sie sind ausgesprochen kurz und sehr fein, ihre Breite beträgt 0,5 bis 0,7 μ , nach der Ablösung bleiben sie oft winkelig zusammengelagert, was auch auf der Abbildung zum Ausdruck kommt.

Beim Vergleich des ganz jungen Mycels von *Pr. nicotinus* I¹, Abb. 10, mit dem frühen Jugendmycel von *Pr. ruber* (Abb. 2) fällt sofort der abweichende Wachstumsmodus und die andersartige Lagerungsweise der Einzelteile in die Augen. Dieses kleine Mycel macht einen viel zusammengefaßteren, beinahe knorrigen Eindruck. Es hat sich aus Schleim und flüssigem Substrat eine kreisförmige Umgebung geschaffen, die es scharf von seiner Umwelt trennt. Bei fortschreitendem Wachstum schließen sich die Einzelteile noch enger zusammen, und die Flüssigkeitsumgrenzung wird breiter.

Abb. 11 gibt eine ältere Kolonie von *Pr. nicotinus* I mit diesen Merkmalen gut wieder. Die kurzen Stäbchen zeigen nur selten Verzweigungen, die immer kurz bleiben. Auch hier kommt oft Winkelagerung der Stäbchen vor. Ihre Breite ist die geringste, die bei den untersuchten Formen beobachtet wurde, sie beträgt nicht mehr als 0,5 μ . Alle Stämme der Gruppe *citreus*, die morphologisch gut übereinstimmt

¹ Die Einstellung ist absichtlich zu hoch, um das Mycel deutlicher erscheinen zu lassen.

sind ausgesprochen zart und stehen in Fadenlänge und Breite den *ruber*-Stämmen weit nach. Auf den Abbildungen kommt diese Übereinstimmung weniger gut zum Ausdruck, weil in Abb. 9 die Flüssigkeitsumgebung fehlt. Das hat aber lediglich im Kulturmedium seine Ursache. Die Kultur der Abb. 11 wuchs auf „Dextrose-Agar“, die der Abb. 9 aber auf „Trypsin-Agar“, dem als Kohlenstoffquelle an Stelle von Dextrose 2% Glycerin zugesetzt waren, was die Schleimbildung immer sehr beeinträchtigt.

Dieser Formtypus der *Proactinomyceten* ist interessant als mögliche Mittelstellung, von der aus einerseits eine Brücke zu schlagen wäre, die über *Proactinomyces flavus* und *ruber* zu den *Actinomyceten* führen würde, und die andererseits bei den *Mycobakterien* mit ihren zarten, wenig verzweigten und winkelligen Stäbchen endet.

Abb. 12 übermittelt das Bild eines ausgesprochen kokkenförmigen Endzustandes von *Pr. nicotinus* II aus den ersten Überimpfungen nach der Isolierung. Wie erwähnt, bildete der Stamm anfangs sehr regelmäßige Kokken von 0,5 bis 0,7 μ Durchmesser. In dieser Gleichförmigkeit und Regelmäßigkeit kam es später weder bei diesem, noch bei irgendeinem anderen Stamm zur Kokkenbildung.

Die Zellformen der Proactinomyceten.

Endstadium. Das jugendliche Mycel aller untersuchten Stämme der *Proactinomyceten* enthält keine Scheidewände. Später wurden in den Fäden, z. B. bei den Stämmen 1, 3, 7, 11, 12 und 20 oft Scheidewände beobachtet, deren Bildung dem Zerfall der Fäden in Stäbchen vorangeht. Die stäbchenförmigen Zellen können sich eine Zeitlang dadurch vermehren, daß sie sich in die Länge strecken und dann nach der Bildung von Querwänden von neuem zerfallen; ähnlich wie Jensen das 1934 für *Mycobakterien* beschrieben hat. Dieser Wachstumsmodus stellt einen wesentlichen Faktor bei der Vermehrung dar. In älteren Kulturen hört jedoch das Längenwachstum der Stäbchen auf, und es entstehen kürzere Formen, die sich nicht mehr teilen. Dieser Vorgang wird dadurch eingeleitet, daß das Plasma innerhalb der Fäden in zylindrische bzw. kugelförmige Teilstücke zerfällt. Gleichzeitig findet eine Kondensierung des Plasmas statt, so daß sich zwischen den Teilstücken gleichmäßige, häufig aber auch unregelmäßige große Zwischenräume bilden, in denen Querwände entstehen. Nach einiger Zeit fallen die Teilstücke auseinander. Die Stäbchen haben zunächst scharfe Ecken, später runden sie sich ab und verkürzen sich ein wenig, auch die kugelförmigen Teilstücke ziehen sich noch etwas zusammen. Dieser Vorgang konnte sehr gut bei *Pr. ruber* dadurch nachgewiesen werden (Abb. 13); daß Stäbchen aus einer 5 Tage alten Massenkultur in Dextroselösung, in der sich besonders lange Stäbchen bilden, 5 Minuten mit 5%iger Salzsäure bei 60° C behandelt wurden. Durch diese partielle Hydrolyse findet in der Stäbchenmembran eine Substanzveränderung statt, durch die sie ihre Färbbarkeit für basische Farbstoffe verliert. Wird nicht hydrolysiertes Material mit wässrigem Methylenblau gefärbt, so zeigen gesunde, lebenskräftige Stäbchen und Fäden eine

blaue, gleichmäßige Färbung, und Innenstrukturen sind nicht erkennbar. Bei hydrolysiertem und gut ausgewaschenem Material erscheint die an sich gut erkennbare Membran nach der Färbung nahezu farblos und im Innern der Fäden liegen tiefblau gefärbte Inhaltsbestandteile. Es sind die soeben besprochenen kondensierten Plasmateilchen. Auch Querwände zwischen ihnen, die in der Photographie leider nicht erkennbar sind, waren im Präparat deutlich sichtbar.

Knospung. Eine von der beschriebenen vollkommen verschiedene Vermehrungsart konnte bei einem Stamm von *Pr. citreus* (Stamm 18) festgestellt werden. Bei diesem entstehen in 5 bis 6 Tage alten Kulturen an manchen Stäbchen senkrecht zur Längsachse am Stäbchenende und an den beiden Seiten Kurztriebe von etwa 5 bis 7 μ Länge. Sie schwellen keulenartig an und lösen sich leicht vom Mutterstäbchen ab (Abb. 14). Die losgetrennten Kurztriebe können selbständig weiter wachsen und sich wie die primär gebildeten Stäbchen durch Streckung und Querwandbildung eine Zeitlang vermehren. Diese Vermehrungsart ist auch von Lieske für seinen „kurzfädigen Stamm 74“ beschrieben worden (S. 79). Er gibt dazu eine schematische Zeichnung, die genau mit der Abb. 14 übereinstimmt. Auch Krassilnikov beobachtete diese Art der Vermehrung. Er bezeichnet sie als Knospung, ein sehr treffender Ausdruck, und erläutert sie ebenfalls durch schematische Zeichnungen, die dem Bild der Abb. 14 gleichen.

Chlamydosporen. Als weitere Zellform gibt Krassilnikov die Bildung von Chlamydosporen an, die bei einem Stamm von *Pr. ruber* in großer Menge entstanden. Bei den hier untersuchten Stämmen wurden sie nie beobachtet.

Kokkoide Dauerformen. Dagegen wurden bei allen Stämmen der Gruppe *citreus* zahlreiche, als „Dauerform“ zu bezeichnende Gebilde gefunden. Sie besitzen Kokkenform, doch übertreffen sie die Größe der normalen Kokken des betreffenden Stammes etwa um das Doppelte; sie können einen Durchmesser von 1,8 bis 2 μ erreichen. Ihre Größe wechselt bei den einzelnen Stämmen, sie ist ebenfalls abhängig vom Nährboden. Auf Gelatinenährböden werden sie besonders groß. Die Dauerformen bilden sich aus Stäbchen, die sich etwas verdicken und in deren Innerem sich größere Plasmateilstücke kondensieren, als in den für den betreffenden Stamm normalen Stäbchen und Kokken enthalten sind. Abb. 15 gibt diesen Vorgang recht gut wieder. Sie ist die Photographie eines Komplexes von Stäbchen aus einer Massenkultur des zur *citreus*-Gruppe gehörigen *Pr. nicotinus* III, die nach der oben beschriebenen Art hydrolysiert und mit Methylenblau gefärbt sind. Die reifen Dauerformen liegen oft einzeln, manchmal zu kleinen Ketten bis zu vier Individuen vereinigt, am häufigsten aber zu zweien und ähneln dann kleinen Hefezellen. In alten Kulturen finden sie sich massenhaft. Sie dürfen nicht verwechselt werden mit Involutionsformen, die sich in alten Kulturen ebenfalls stets finden. Diese können spindel- und keulenförmige Gestalt besitzen und mit Auswüchsen versehen sein, oft aber auch in Form und Größe den Dauerformen sehr ähneln. Bei sorgfältiger Beobachtung sind sie jedoch auch in ungefärbten Präparaten von den Dauerformen unschwer zu unterscheiden.

durch die stärkere Lichtbrechung und das kompaktere Plasma der Dauerformen. Die durch Aufquellung entstehenden Involutionsformen sind meistens vakuolenreich und zeigen im Innern oft unregelmäßige Strukturen. In hydrolysierten und mit Methylenblau gefärbten Präparaten sind sie verschwunden, auf neuem Nährmedium keimen sie nicht.

Die Dauerformen dagegen nehmen auf neuem Substrat das Wachstum wieder auf, und zwar treiben sie nach Art der Pilzsporen einen oder mehrere kleine Keimschläuche aus, die zu Mycelien heranwachsen. In der durch Abb. 16 wiedergegebenen Kultur lagen drei Dauerformen kettenförmig beieinander. Aus allen dreien ist ein Keimschlauch entstanden, von denen der eine leider nicht in der Bildebene lag. Die in der Umgebung liegenden Gebilde sind Verunreinigungen des Agars, die nicht entfernt werden konnten. Die Dauerformen müssen also durch ihre Entwicklung als Sporen bezeichnet werden. Auch färbemischen Einflüssen gegenüber verhalten sie sich wie diese. Wird ein Präparat aus einer Massenkultur, die Dauerformen enthält, 2 Minuten lang mit kalter, schwefelsäurefreier 5%iger Chromsäure und darauf 1 Minute mit heißer Carbolfuchsinlösung behandelt und wenige Sekunden mit 5%iger Schwefelsäure differenziert, so halten sie die rote Färbung fest, während die ganze Umgebung entfärbt wird.

Bei den Dauerformen konnte eine Veränderung der Membran gegenüber der Zellwand der übrigen Mycelteile nicht nachgewiesen werden. Eine Verdickung der Membran war insofern nicht festzustellen, als es nicht gelang, die Membran zu färben. Mit Chlorzinkjod und anderen Jodreagentien (*A. Meyer*) konnte keine Färbung erzielt werden. Säuren und Laugen gegenüber verhält sich die Membran der Dauerformen nicht anders als die der übrigen Zellen. Wie erwähnt, könnte die Hydrolyse mit heißer 5%iger Salzsäure leicht bewerkstelligt werden. 20%ige Natronlauge von 100° C löste in einer halben Stunde die Membranen aller Stämme vollständig. Kalilauge von 0,5% wirkte bei 100° in 3 Stunden wenig ein. 5%ige Schwefelsäure löste in 4 Stunden bei 85° C die Membranen aller *citreus*- und *flavus*-Formen vollkommen; die der *ruber*-Stämme waren etwas widerstandsfähiger, unter ihnen besonders diejenigen der *Stämme* 1 und 12. Aber auch sie waren stark angegriffen, so daß gesagt werden kann, daß sich alle verhältnismäßig leicht hydrolysieren lassen. Danach dürften die Zellwände zu den Hemicellulosen gerechnet werden.

Schleimschicht. Daß eine Schleimschicht bei manchen *Proactinomyceten* in starkem Maße vorhanden ist, zeigten mehrere Photographien. Der Grad ihrer Ausbildung ist abhängig vom Kulturmedium; auf Dextroseagar ist sie um die Zellen bzw. Fäden immer gut ausgebildet und bei allen Stämmen mit feuchter bis sehr feuchter und schleimiger Konsistenz (Tabelle I) vorhanden. Bei *Stamm* 5 und 6 (*ruber*) bestehen die äußeren Partien der Gesamtmembran aus sehr wasserhaltigem Schleim, die Kulturen sind derartig feucht, daß sie vom Nährboden des Schrägagarröhrchens herunterrutschen und nur eine dünne Kulturschicht auf den oberen Teilen des Nährbodens haften

bleibt. Der Nachweis der Schleinsubstanz bei den einzelnen Individuen erfolgt am besten mit der von Bütschli eingeführten Tuschemethode. Die Färbung gelingt gut mit einer mäßig konzentrierten Methylviolettlösung in 30%igem Alkohol (A. Meyer, S. 179) nach einer Färbedauer von etwa 3 Stunden. Mit Jodjodkalium bleibt der Schleim ganz ungefärbt. Bei jungen Kolonien der *nicotinus*-Stämme, die von einer dicken, schwach lichtbrechenden Zone umgeben sind, konnte festgestellt werden, daß diese Zone sich nicht einheitlich färbte. Es waren in ihr mehr oder weniger feine, fadenartige Partien violett gefärbt, die vom Außenrande her zu einzelnen Stäbchen des Innenrandes hinübergreifen, so daß die ganze Zone mit ihnen durchzogen war. Diese besteht also nur teilweise aus Schleim. Sie dürfte als Ganzes zusammengesetzt sein aus dem Atmungswasser der Bakterien und wässerigen Substanzen, die dem Nährboden entzogen wurden. Schon Arthur Meyer (S. 153) hat auf die Möglichkeit hingewiesen, daß gewisse Schleime zur Aufsaugung des Wassers aus dem Nährboden besonders befähigt sein könnten.

Verhalten bei der Gramfärbung. Gray und Thornton, Jensen und Krassilnikov geben übereinstimmend an, daß ihre Stämme sich nach Gram färbten. Ich kann das für alle bestätigen, ausgenommen für die Stämme der gelb- bis braungrünen Gruppe. Die Färbung wurde vorgenommen mit Karbol-Gentianaviolett, die Nachfärbung $\frac{1}{2}$ Minute mit wässriger Fuchsinlösung 1:10; es sei ausdrücklich bemerkt, daß stets nur gleiche Entwicklungszustände der Kulturen verglichen wurden. In 1 bis 2 Tage alten Kulturen der Stämme 18 bis 25 (*citreus*) auf 1%igem Dextroseagar sind alle Kulturformen ausgesprochen gramnegativ. Es sind noch keine Ansätze zur Bildung von Dauerformen zu erkennen. In 9 Tage alten Kulturen erscheinen unverdickte, lebensfähige Stäbchen gramnegativ, Involutionsformen gramnegativ, die gut ausgebildeten Dauerformen und die Anlagen zu diesen jedoch grampositiv. Die Stämme 18 bis 25 sind also als gramlabil zu bezeichnen.

Widerstandskraft gegen hohe Temperaturen. Gegen langandauernde Temperaturerhöhungen sind die Dauerformen nicht widerstandsfähiger als die übrigen Zellen. Erwärmung auf 50° während 20 Stunden überlebten nur die Stämme 1, 3 und 4, also ausschließlich *Pr. ruber*. Erhitzung auf 60° C während 1 Stunde vertrugen sämtliche Formen der orangefarbenen bis dunkelroten Gruppe und außerdem *Pr. citreus* (Stamm 18 und 19). Alle anderen Formen, also die beiden *flavus*-Stämme und alle Vertreter von *Pr. nicotinus*, waren abgestorben.

Physiologische Merkmale der Proactinomyceten.

Nährböden. Die *Proactinomyceten* lassen auf verschiedenen Nährböden Unterschiede in der Entwicklung erkennen, deren Ursache aller Wahrscheinlichkeit nach auch in ihren mehr oder weniger nahen verwandtschaftlichen Beziehungen zu den *Actinomyceten* zu suchen sind. So wuchsen z. B. alle roten bis orangefarbenen Stämme ausgezeichnet auf einem Agar, der häufig für die Kultur von *Actinomyceten* verwendet wurde (v. Plotho, 1940): Dextrose 1%, Tyrosin 0,1%, K_2HPO_4 0,1%, NaCl 0,2%, $MgSO_4$ 0,0005%, $FeSO_4$ 0,001%, $CaCO_3$ 0,001% (präzip.). Viele Stämme hatten hier eine

weniger feste Konsistenz und vermochten dem Agar derartig viel Wasser zu entziehen, daß es sich am Grunde des Reagensglases ansammelte und der Nährboden im oberen Teil des Schrägagarröhrchens direkt austrocknete. Die gelben und gelbgrünen Stämme dagegen zeigten auf diesem Substrat ein sehr schlechtes, oft überhaupt kein Wachstum. Ein gleiches Ergebnis hatte die Kultur auf einem von Waksman für Actinomyceten empfohlenen Medium: Saccharose 2%, KNO_3 0,2%, K_2HPO_4 0,1%, MgSO_4 0,005%, NaCl 0,05% (gepuffert mit CaCO_3). Die Formen der gelbroten Gruppe gediehen sehr gut, aber die Entfaltung aller Stämme der citreus-Gruppe war auf ihm so schlecht, daß der Nährboden nur selten verwendet wurde. Gleichmäßiger war die Entwicklung auf einer im folgenden als „Ammonphosphatagar“ bezeichneten, von Jensen 1934 für Mycobakterien angegebenen verhältnismäßig einfachen Kombination: $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0,2%, K_2HPO_4 0,1%, MgSO_4 0,05%, NaCl 0,05%, dazu 1% Dextrose oder eine andere C-Quelle. Das Wachstum auch der gelbgrünen Stämme war hier recht befriedigend. Im allgemeinen entwickeln sich die Stämme der Gruppe ruber gut auf synthetischem Agar, die der citreus-Gruppe aber ziehen organische Nährböden vor. Eine Ausnahme hiervon macht die Bierwürze. Auf ihr wachsen alle roten bis orangefarbenen Proactinomyceten ausgezeichnet, ihre Zellen sind größer, der Durchmesser der Mycelien stärker als auf synthetischen Nährböden. Die gelben und gelbgrünen aber gedeihen nur kümmerlich, ihre Stäbchen bleiben sehr dünn, die Kolonien klein.

Von komplexen organischen Substraten wurde am häufigsten der im folgenden als „Dextrosenährboden“ bezeichnete in fester und flüssiger Form verwendet: Dextrose 1%, Pepton-Witte 1,2%, Liebig's Fleischextrakt 0,6%, NaCl 0,2%. An Stelle von Dextrose trat nicht selten 2% Glycerin, an Stelle von Pepton-Witte 1,2% Trypsin-Pepton aus Stierhoden nach Grüber. Auf diesen Medien entwickelten sich alle Stämme gut.

Auf Kartoffeln und Steckrüben wuchsen ebenfalls die Stämme der ersten Gruppe besser als die der beiden anderen. Bei *Pr. citreus* bleiben die Fäden besonders fein und erreichen oft nur $0,3\ \mu$ Durchmesser. Auch hier fällt die starke Wasserentziehung durch junge, kräftige Kolonien der ruber-Formen auf.

Inhaltsstoffe. Über Inhaltsstoffe der Proactinomyceten liegen in der Literatur keine Mitteilungen vor, und die hier durchgeführten Untersuchungen erzielten wenig positive Ergebnisse. Volutin fand sich nie, auch Jogen und Glykogen konnte nicht festgestellt werden. In 4 Wochen alten Kulturen in Dextroselösung hatten *Pr. ruber* (Stamm I) und *Pr. pyridinus* III Fett gebildet (Nachweis durch α -Naphthol und Sudan III). Die kugeligen Einschlüsse lagen nur in den Fäden, in ruhenden Zellen oder Involutionsformen wurden sie nie gefunden. Die Dauerformen enthielten keinen der erwähnten Inhaltsstoffe.

Säurebildung. In der letzten Ausgabe seines Handbuches gibt Bergey für eine Anzahl der aufgeführten Proactinomyceten (*Pr. agrestis*, *crystallophagus*, *coeliacus*, *actinomorphus* und *globulus*) als wesentliches Merkmal das Ausbleiben der Säurebildung auf Dextrosenährböden und anderen Zuckerarten an. Dies schien sich zunächst für gewisse Stämme zu bestätigen. Sie sind in der dritten Vertikalreihe der Tabelle II als erste eingereiht. Den alkalibildenden Stämmen sind die fünf an letzter Stelle stehenden gegenübergestellt, die die Wasserstoffionenkonzentration erhöht hatten. Zur Nachprüfung dieses Ergebnisses

Tabelle II. Säurebildung auf Dextroselösung.
Ausgangs- p_H 6,8, Temperatur 25—27° C.

Nr. des Stammes	Alter der Kultur in Tagen	End- p_H	Alter der Kulturen in Tagen	End- p_H	Art der Säure
7	22	8,2	12	4,6	Milchsäure
9	22	8,5	12	4,7	"
12	22	8,5	12	4,7	"
15	22	8,5	12	4,5	"
20	22	8,2	12	4,5	"
21	22	8,2	12	4,3	"
16	22	6,4	22	4,7	"
17	22	6,4	22	4,3	"
22	22	6,0	22	4,3	"
24	22	6,2	22	4,8	"
25	22	6,2	22	4,7	"

wurden die gleichen Stämme von neuem in Dextroselösung geimpft und schon nach 12 Tagen auf Säurebildung untersucht. Das Ergebnis zeigt gleichfalls die Tabelle II in ihrer 5. Vertikalreihe. Es geht aus ihr hervor, daß *alle* Stämme zu Beginn der Entwicklung Säure bilden und daß die ungleiche Reaktion des Kulturmediums erst beim weiteren Wachstumsverlauf der Organismen entsteht. Da es ausschließlich diejenigen Stämme sind, deren Entwicklungszyklus sehr schnell abläuft, die bei längerer Kulturdauer die alkalische Reaktion verursachen, so ist anzunehmen, daß diese auf autolytische Vorgänge zurückzuführen ist. Als Autolyseprodukt der organischen Stickstoffverbindungen tritt auch bei *Proactinomyces* wie bei anderen Mikroorganismen Ammoniak auf, worauf das Ansteigen der Alkalität zurückzuführen sein dürfte. Bei diesen schnell wachsenden Formen wird die anfängliche Säurebildung bald überdeckt durch die reichliche Bildung von alkalischen Abbauprodukten. Die Erhöhung der H-Ionenkonzentration ist nach 12tägiger Kulturdauer überall fast die gleiche, aber die Neigung, sie bei längerer Kulturdauer herabzusetzen, ist deutlich auch bei den letzten Stämmen im Vergleich mit der 22tägigen Kulturdauer zu erkennen. Ihr Entwicklungsgang läuft aber langsamer ab, und daher ist die durch die Wirkung der Autolyseprodukte verursachte Herabsetzung der H-Ionenkonzentration noch nicht sehr beträchtlich, und der Anstieg der Alkalität nach 22 Tagen noch nicht so hoch wie bei den schnell wachsenden. Die gleichen Verhältnisse liegen bei anderen Zuckerarten vor. Unter den hier besprochenen Formen waren jedenfalls keine, die nicht zu Anfang ihres Wachstums Säure gebildet hätten.

Die als Zwischenprodukt des Kohlenhydratstoffwechsels gebildete Säure wurde bei allen Stämmen als Milchsäure identifiziert. Ihr Nachweis erfolgte nach der sehr empfindlichen Methode von *Denigès* (*Bernhauer*), sowie mit verdünnter Eisenchloridlösung (*Seifert* und *Müller*). Da sie mit Brenztraubensäure verwandt ist, wurde überall auch auf diese geprüft, die sich jedoch nie nachweisen ließ.

Im folgenden sind weitere Untersuchungen zur Prüfung weiterer fermentativer Fähigkeiten der *Proactinomyceten* wiedergegeben:

Verhalten zu Cellulose. Keiner der untersuchten Stämme war imstande, Cellulose zu zersetzen. Diese Fähigkeit scheint in der Gattung ziemlich selten zu sein. Daß sie vorkommt, beweisen die Beobachtungen von *Bokor*, dessen Organismus ausgezeichnet auf ihr gedieh und ihre Aufhellung und kaffeebraune Verfärbung herbeiführte.

Gelatineverflüssigung. Als sehr konstantes und bezeichnendes Merkmal erwies sich das Verhalten der *Proactinomyceten* auf *Gelatine-nährböden*, das wegen des verschiedenen p_H -Bereiches der wirksamen Enzyme bei zwei verschiedenen Konzentrationen der Wasserstoffionen (*Ammon-Dirscherl*) untersucht wurde. Es wurden nebeneinander zwei Versuchsreihen beimpft, von denen die eine auf ein p_H von 7, die andere auf ein p_H von 5,8 eingestellt wurde. Zur Verwendung kam ausschließlich Fleischextrakt-Pepton-Dextrose-Gelatine, die Kulturen wuchsen im Licht bei Zimmertemperatur. Über das Ergebnis unterrichtet Tabelle III. Das Ergebnis ist eindeutig. Sowohl in der neu-

Tabelle III. Verflüssigung der Gelatine.

Nr. des Stammes	Verflüssigung		Beginn der Verflüssigung in Tagen nach der Impfung	
	Versuchsreihe p_H 7	Versuchsreihe p_H 5,8	Versuchsreihe p_H 7	Versuchsreihe p_H 5,8
1 bis 15	— ¹	—	—	—
16	+ ²	+	28	30
17	+	+	32	35
18	+	+	7	8
19	+	+	6	6
20	+	+	7	9
21	+	+	6	10
22	+	+	9	9
23	+	+	9	10
24	+	+	8	8
25	+	+	10	12

¹ Keine Verflüssigung. — ² Verflüssigung.

tralen, als auch in der sauren Versuchsreihe verflüssigten alle roten bis orangefarbenen Stämme (Nr. 1—15) nicht, alle gelb- bis braungrünen verflüssigten. Das Wachstum war bei allen Stämmen sehr gut. Im allgemeinen trat die Verflüssigung in der sauren Versuchsreihe etwas später ein als in der neutralen. Auffällig ist das Verhalten der *flavus*-Stämme (Nr. 16 u. 17). Bei ihnen beginnt der Vorgang erst sehr spät und ist nicht sehr wirksam, ein großer Teil der Gelatine bleibt immer unverflüssigt, trotz des guten Wachstums beider Organismen auf ihr. Eine Nachprüfung hatte das gleiche Ergebnis. Wegen des späten Einsetzens der Verflüssigung erscheint es zweifelhaft, ob es zulässig ist, diese langsame Verflüssigung in eine Reihe zu stellen mit der ziemlich früh einsetzenden der gelbgrünen Stämme. Es wäre möglich, daß sie erst entstünde, nachdem die Zellen abgestorben sind und

die Enzyme dadurch aus ihnen befreit wurden und wirksam werden konnten. In diesem Fall müßten die *flavus*-Stämme gegenüber den schnell verflüssigenden *citreus*-Formen als inaktiv bezeichnet werden.

Stärkehydrolyse. Zur Prüfung auf ihr Vermögen, *Stärke* zu hydrolysieren, wurden die Stämme in Petri-Schalen auf Ammonphosphatagar geimpft. Als Kohlenstoffquelle wurde 1% *Stärke* zugesetzt. Zur Feststellung der Wirkung wurde auf das Agar nach der angegebenen Kulturdauer eine dünne Schicht *Lugolscher* Lösung gegossen. Das unveränderte Agar färbt sich tief blau, die hydrolysierte Zone erscheint völlig farblos. Das von der Tabelle IV ausgewiesene Ergebnis ist nahezu

Tabelle IV. Hydrolysierung der *Stärke*.
Alter der Kulturen 15 Tage, pH 6,8, Temperatur 23—25°.

Nr. des Stammes	Hydrolysierung	Wachstum	Nr. des Stammes	Hydrolysierung	Wachstum
1	— ¹	sehr schwach	14	—	schlecht
2	—	sehr schwach	15	—	gering
3	—	sehr schwach	16	+ ²	mäßig
4	—	kein Wachstum	17	+	mäßig
5	—	kein Wachstum	18	—	gut
6	—	kein Wachstum	19	++ ³	gut
7	—	sehr gering	20	++	gut
8	—	sehr gering	21	++	gut
9	—	sehr gering	22	++	sehr gut
10	—	sehr gering	23	++	gut
11	—	sehr gering	24	++	gut
12	—	schlecht	25	++	sehr gut
13	—	schlecht		++	

¹ Keine Hydrolysierung. — ² Hydrolysierung. — ³ Starke Hydrolysierung.

ebenso eindeutig wie bei der Gelatineverflüssigung. Alle roten bis orangefarbenen Stämme vermochten die *Stärke* nicht zu hydrolysieren bis auf *Pr. anilinus* II, der eine schmale, rötlich aufgehellte Zone geschaffen hatte, in der die Hydrolysierung also nur bis zum Dextrin vorgeschritten war. Von den *flavus*-Stämmen hatte *Stamm* 16 schwach hydrolysiert, *Stamm* 17 nicht. Alle Vertreter der gelbgrünen Gruppe dokumentierten dagegen durch eine breite farblose Zone um die Kolonie herum ihr starkes Hydrolysevermögen. Bei *Stamm nicotinus* VI (Nr. 25) war sie mit fast 2 cm Breite die größte von allen, bei *Pr. citreus* und *nicotinus* I und II war sie nahezu gleich breit. Das Wachstum ist bei den roten bis orangefarbenen Formen sehr schwach oder bleibt ganz aus, bei den übrigen ist es zum Teil sehr gut.

Verhalten in Milch. Das Wachstum der *Proactinomyceten* in *Milch* und die in ihr hervorgerufenen Veränderungen zeigt Tabelle V. Aus ihr gehen die starken fermentativen Fähigkeiten der gelb- bis braungrünen Stämme wieder sehr klar hervor. Von *Pr. citreus* (*Stamm* 18 und 19) wird die *Milch* peptonisiert. Der Vorgang beginnt bei der angegebenen Temperatur bereits nach 4 bis 5 Tagen, die *Milch* wird dabei leicht bräunlich und durchscheinend, die H-Ionenkonzentration er-

Tabelle V. Wachstum in Milch (enfettete). Alter der Kulturen 20 Tage, Anfangs pH 6,6, Temperatur 25–27° C.

Nr. des Stammes	Koagulierang	Peptonisierung	End-pH	Beschaffenheit der Milch	Wachstum
1	—	—	6,8	unverändert	gut, roter Bodensatz
2	—	—	6,8	unverändert	gut
3	—	—	7,0	unverändert	gut, rötlicher Bodensatz
4	—	—	7,0	unverändert	gut
5	—	—	6,8	unverändert	gut, rötlicher Bodensatz
6	—	—	6,8	unverändert	gut
7	—	—	6,8	unverändert	gut
8	—	—	6,8	unverändert	gut
9	—	—	6,8	unverändert	gut
10	—	—	6,8	unverändert	Bodensatz und gelblicher Ring am Reagensglas
11	—	—	6,8	unverändert	dicker Bodensatz
12	—	—	7,0	unverändert	Bodensatz und Reagensglasring
13	—	—	7,2	leicht gelb	Bodensatz und Reagensglasring
14	—	+	7,2	leicht rötlich	Bodensatz
15	—	+	7,2	leicht bräunlich	Bodensatz
16	—	+	7,2	unverändert	gut
17	—	+	7,0*	bräunlich, durchscheinend	gut
18	—	+	7,2	bräunlich, durchscheinend	mäßig
19	—	+	7,4	hellbräunlich, durchscheinend	mäßig
20	anfangs koaguliert, Koagulat wieder aufgelöst	—	8,0	wässrig	gut
21	dasselbe	—	8,2	mittelbraun, fadenziehend, wässrig	gut
22	dasselbe	—	8,2	hellbräunlich, wässrig	gut
23	dasselbe	—	8,0	hellbräunlich, wässrig	gut
24	dasselbe	—	8,2	hellbräunlich, wässrig	gut
25	dasselbe	—	8,2	hellbräunlich, wässrig	gut

niedrigt. Alle *nicotinus*-Stämme koagulieren anfangs die Milch, lösen dann aber das Koagulat vollständig wieder auf. Dabei wird die Milch stark alkalisch, mit *Nesslers* Reagens konnte reichlich Ammoniak nachgewiesen werden. Von den *flavus*-Stämmen peptonisierte der *Stamm 16*, der *Stamm 17* jedoch nicht. Von den roten bis orangefarbenen besaßen nur *Pr. anilinus I* und *II* die Fähigkeit, die Milch zu peptonisieren, alle anderen vermochten sie weder zu peptonisieren noch zu koagulieren, trotz des guten Wachstums in ihr. Die Reaktion der Milch wird dabei wenig verändert.

Ein weiterer Hinweis auf die engere Verwandtschaft unter den Stämmen, die in unseren Untersuchungen zu einer Gruppe zusammengeschlossen sind, sei kurz angeführt: In einer Dextroselösung bewirken sämtliche gelben, gelbgrünen und braungrünen Stämme im Verlauf des Wachstums eine Trübung der Lösung, während alle orangefarbenen bis hochroten sie klar lassen. Außerdem entsteht bei den zuerst genannten Stämmen immer nur ein mehr oder weniger dicker Bodensatz, eine Oberflächenschicht wird niemals gebildet. Im Gegensatz hierzu wachsen die Kulturen der roten bis orangefarbenen Stämme mit Ausnahme der *Stämme 3, 5, 6* und *9* am Rand des Reagensglases in die Höhe und bilden eine oft schuppige Oberschicht.

Verhalten zu zyklischen Verbindungen. Von *Gray* und *Thornton* sowie von *Jensen* wurden einzelne Stämme von *Proactinomyceten* auf zyklischen und heterozyklischen Verbindungen kultiviert. Es war daher interessant, zu beobachten, wie sich die Vertreter der verschiedenen hier aufgestellten Gruppen auf solchen Verbindungen verhalten würden. Ebenso erschien es lohnend, das Wachstum der Stämme auf Indol zu kontrollieren, da *Bergey* 1939 in seiner zum ersten Male aufgestellten Systematik der *Proactinomyceten* als obersten Einteilungsgrund die Bildung von Indigotin aus Indol einführt. Zur Durchführung dieser, in der Tabelle VI zusammengefaßten Versuche wurde dem Ammonphosphat-Nährboden als C-Quelle an Stelle von Dextrose jeweils 0.01% Phenol, Naphthalin oder Indol zugesetzt.

Die Tabelle zeigt, daß die Wachstumsintensität auf allen drei Nährböden sehr gering war. Am besten gediehen die Organismen noch auf Phenol, aber auch hier blieben die Kolonien sehr klein. Alle *ruber*-Stämme wuchsen sehr kümmerlich, zwei von ihnen überhaupt nicht. *Pr. pyridinus I, II* und *III* entwickelten sich etwas besser, *pyridinus IV* fiel aber ganz aus. *Pr. piperidinus I* und *II* waren am kräftigsten entwickelt, *piperidinus III* konnte sich auf Naphthalin nicht durchsetzen. *Pr. anilinus II* wuchs verhältnismäßig gut auf allen drei Substraten, während *anilinus I* nur auf Phenol gedieh. Von den übrigen Gruppen dagegen konnte sich kein einziger Stamm auf diesem Medium behaupten. Auf Indol fand die schwächste Entwicklung statt. Immerhin fällt auf, daß nur *pyridinus I* und *III*, *piperidinus I* und *II* und *anilinus II* wuchsen, alles Stämme mit besonderer Abbaufähigkeit. Ähnlich schwach ist die Entwicklung auf Naphthalin, auf dem auch nur die gleichen Stämme mit besonderer Fähigkeit zu geringer Entfaltung kamen.

Tabelle VI. Wachstum auf Spezialnährböden.
Anfangs-pH 6,8, Temperatur 25—27° C, Alter der Kulturen 7 Tage.

Nr. des Stammes	Wachstum auf Phenol	Wachstum auf Naphtalin	Wachstum auf Indol	Nr. des Stammes	Wachstum auf Phenol	Wachstum auf Naphtalin	Wachstum auf Indol
1	± ¹	—	—	14	+	—	—
2	+	—	—	15	+	+	+
3	+	—	—	16	—	—	—
4	+	—	—	17	—	—	—
5	—	—	—	18	—	—	—
6	—	—	—	19	—	—	—
7	+	+	+	20	—	—	—
8	+	—	—	21	—	—	—
9	+	+	+	22	—	—	—
10	—	—	—	23	—	—	—
11	+	+	+	24	—	—	—
12	+	+	+	25	—	—	—
13	+	+	—				

¹ ± sehr geringes Wachstum.

Aus den obigen Ausführungen ist wohl klar geworden, daß die widerstandsfähigsten und wuchskräftigsten Formen, die sich auf den verschiedensten Substraten durchzusetzen vermögen, unter den Vertretern der roten bis orangefarbenen Gruppe zu finden sind, daß aber die gelben und besonders die gelb- bis braungrünen Stämme ihnen in ihren fermentativen Fähigkeiten weit überlegen sind.

Vergleichende Untersuchungen mit verschiedenen Stickstoff- und Kohlenstoffquellen.

In der Literatur finden sich keine vergleichenden Untersuchungen über die Wirkung verschiedener Stickstoff- und Kohlenstoffquellen auf *Proactinomyceten*; es erschien daher erwünscht, hierüber einige Aufklärungen zu erhalten.

Zu solchen Untersuchungen können natürlich nur Nährmedien mit genau bekannter Zusammensetzung in Frage kommen. In Vorversuchen wurden zahlreiche Parallelkulturen auf dem *Waksman*- und dem Ammonphosphatnährboden verglichen, um die mehr oder weniger gute Eignung der beiden Kombinationen festzustellen. Es erwies sich dabei, daß der *Waksman*-Nährboden von einigen Stämmen sehr schlecht ausgenutzt wurde, was auf die geringere Assimilierbarkeit der Kohlenstoffquelle zurückzuführen sein könnte, wie spätere Untersuchungen erweisen werden, was möglicherweise aber auch in der Stickstoffquelle seine Ursache hatte. Daher wurde in der Folge ausschließlich mit dem Ammonphosphatnährboden gearbeitet, auf dem alle Stämme gleichmäßiger wuchsen. Die Untersuchungen wurden nach der älteren Verwendungsstoffwechselmethode ausgeführt durch Beobachtung wachsender Organismen in Lösungen. Es wurden immer 2, oft 3 Parallelversuche angesetzt, so daß die angegebenen Zahlen der Mycelgewichte Durchschnittsergebnisse mehrerer Versuche darstellen. Die Kulturen wuchsen in kleinen Erlenmeyer-Kolben, die je 10 ccm Lösung enthielten. Für die Versuche wurde

je ein Stamm von *Pr. ruber*, *pyridinus*, *piperidinus*, *anilinus*, *flavus*, *citreus* und *nicotinus* ausgewählt, da es unmöglich war, sie an allen Formen durchzuführen. Es soll zunächst über die Untersuchungen mit unterschiedlichen Stickstoffquellen berichtet werden.

Tabelle VII. Vergleich der Stickstoffquellen.
Anfangs-pH 6,8, Alter der Kulturen 12 Tage.

Name des Stammes	0,2% (NH ₄) ₂ HPO ₄		0,2% KNO ₃		0,2% (NH ₄) ₂ SO ₄		0,2% NH ₄ Cl	
	End-pH	Trocken- gewicht in mg	End-pH	Trocken- gewicht in mg	End-pH	Trocken- gewicht in mg	End-pH	Trocken- gewicht in mg
<i>Pr. ruber</i> Nr. 2	5,8	13,5	6,8	6,7	5,6	12,0	4,9	5,9
<i>Pr. pyri- dinus III</i>	4,6	20,3	6,8	8,8	4,7	6,8	4,3	7,8
<i>Pr. piperi- dinus II</i>	4,3	20,5	8,0	39,0	4,5	17,6	3,9	10,0
<i>Pr. ani- linus II</i>	4,7	16,4	5,1	15,5	4,1	8,3	4,1	6,5
<i>Pr. flavus</i>	4,7	6,4	4,8	7,4	4,7	—	5,5	—
<i>Pr. citreus</i>	4,5	6,1	6,8	3,2	6,8	0,7	5,3	4,7
<i>Pr. nico- tinus I</i>	4,5	5,9	6,8	5,3	4,7	2,5	5,3	4,7

Stickstoffquellen. Aus Tabelle VII ergibt sich, daß von anorganischen N-Quellen Ammonphosphat im allgemeinen die günstigste Stickstoffquelle für *Proactinomyceten* darstellt. Bei dieser Beurteilung darf das Abfallen der Mycelgewichte der drei zuletzt aufgeführten Stämme nicht ohne weiteres als ungünstiges Merkmal aufgefaßt werden. Das starke Hervortreten der rotgelben Stämme mit spezifischer Abbaufähigkeit muß besonders gewertet werden, was aus den weiteren Versuchen mit großer Deutlichkeit hervorgeht und ausführlich besprochen werden wird. *Pr. flavus* und *citreus* können nur verglichen werden mit *Pr. ruber*. Auch dann ist ihre Entwicklung bei dieser quantitativen Auswertung scheinbar bedeutend zurückgeblieben. Der Bau dieser Stämme ist aber, worauf bereits verschiedentlich hingewiesen wurde, weitaus zarter und feiner als der der rotgelben Gruppe, so daß die mengenmäßigen Erträge der beiden Reihen nicht schematisch verglichen werden können. Bei Berücksichtigung dieser Verhältnisse ist das Ergebnis der Mycelgewichte der erwähnten Stämme nicht ungünstig, was besonders beim Vergleich mit den Erträgen auf den anderen Stickstoffquellen hervortritt. Sehr auffällig ist die außerordentlich kräftige Entwicklung von *Pr. piperidinus* mit KNO₃ als Stickstoffquelle mit der gleichzeitig starken Erhöhung der Alkalität bei der Verarbeitung dieses physiologisch alkalischen Stickstoffsalzes. Von diesem Stamm lagen drei Parallelkulturen vor, von denen je 41,2, 41,4 und 37,6 mg Kulturgewicht geerntet wurden. Die Kulturflüssigkeiten waren beim Abbrechen des Versuchs dunkelbraun, sehr schleimig und faden-

ziehend. Die Ursache dieser außergewöhnlich großen Erhöhung der Wachstumsintensität konnte nicht ermittelt werden. Mit Ausnahme dieses einen Stammes ist der Abfall in der Entwicklungshöhe der übrigen Nitratkulturen der Ammonphosphatreihe gegenüber aber ziemlich beträchtlich. Er ist auch in der Reihe der Ammonsulfat- und Ammonchlorid-Kulturen vorhanden. Bei diesen dürfte er nicht so sehr zurückzuführen sein auf die Verschiebung der pH -Werte in den sauren Bereich, denn diese findet auch in den Kulturen mit Ammonphosphat statt, als auf die Wirkung des SO_4 -Ions und des Chlorions, die beide der Entwicklung abträglich zu sein scheinen. Bei Verwendung synthetischer Nährböden für die Kultur der *Proactinomyceten* wäre es also zweckmäßig, möglichst solche mit Ammonphosphat als Stickstoffquelle zu benutzen.

Krassilnikov gibt ganz kurz an, daß Monosen und Biosen gut ausgenützt würden, Lactose oft besser als die anderen. Jensen untersuchte seine Stämme meistens auf Dextrosenährböden und beobachtete bei Verwendung anderer Kohlenhydrate, z. B. Lactose und Saccharose, in erster Linie die Säurebildung.

Zu meinen Versuchen benutzte ich die Ammonphosphatlösung, zu der an Stelle von Dextrose jeweils 1% des zu prüfenden Zuckers bzw. 0,1% der organischen Säure zugesetzt wurde. Höhere Säurekonzentrationen wurden von den Organismen nicht vertragen, vielleicht wegen der großen Menge von Alkali, das zur Neutralisation hinzugegeben werden mußte. Die Kulturen der Tabellen VIII und IX wuchsen ebenfalls in kleinen Erlenmeyer-Kolben, die 10 ccm Nährlösung enthielten, auch die übrigen Verhältnisse waren die gleichen wie bei den soeben besprochenen Versuchen.

Kohlenstoffquellen.

Bei den Untersuchungen mit verschiedenen organischen Säuren als C-Quelle (Tabelle VIII) stellte sich heraus, daß die *Proactinomyceten* diesen Verbindungen gegenüber viel anspruchsvoller und empfindlicher sind als *Actinomyceten* und *Mycobakterien*. Sie entwickeln sich einigermaßen gut nur mit ganz wenigen dieser Substrate, die daher als einzige in der Tabelle VIII aufgeführt sind. Von den niederen gesättigten Monocarbonsäuren erwies sich die Ameisensäure als ungeeignet. Es war nur *Pr. piperidinus* II, der sich überall als der kräftigste erwies, gewachsen, aber auch sein Wachstum war auf ihm sehr gering. Allerdings wurde das p_H der Säure durch alle Stämme erniedrigt, was darauf schließen läßt, daß die Säure angegriffen wurde, der Aufbau neuer Zellsubstanz konnte aber nicht erreicht werden. Dieses Verhalten der *Proactinomyceten* stimmt mit dem vieler anderer Mikroorganismen überein, die die Ameisensäure als Aufbaumaterial ablehnen. Die Essigsäure erwies sich dagegen als ein geeignetes Substrat, in dem die höchsten Gewichte der ganzen Versuchsreihe überhaupt festgestellt werden konnten. Auch das ist kein außergewöhnliches Verhalten, gehört doch die Essigsäure zu der Reihe der zellvertrauten Verbindungen, die von fast allen Bakterien angegriffen werden. Auffallend dagegen ist, daß in ihr die „Giftersetzer“ der gelbroten Gruppe sich so bedeutend besser entfalteten als die übrigen Stämme. Auch vor dem mit

Tabelle VIII. Organische Säuren als Quelle.
Anfangs- p_H 6,8—7, Alter der Kulturen 12 Tage, Temperatur 25—27° C.

Name des Stammes	Essigsäure		Bernsteinsäure		Citronensäure	
	End- p_H	Trocken- gewicht in mg	End- p_H	Trocken- gewicht in mg	End- p_H	Trocken- gewicht in mg
<i>Pr. ruber</i> Nr. 2	7,4	8,7	7,0	10,2	7,2	12,5
<i>Pr. pyridinus</i> III	9,4	42,6	7,4	6,8	7,2	7,5
<i>Pr. piperidinus</i> II	8,2	40,1	6,9	9,6	7,4	8,2
<i>Pr. anilinus</i> II	7,2	16,9	7,0	2,6	7,0	6,8
<i>Pr. flavus</i>	8,2	6,5	6,6	5,2	—	—
<i>Pr. citreus</i>	8,0	4,1	7,7	3,3	7,0	6,2
<i>Pr. nicotinus</i> I .	6,6	3,2	7,0	3,6	6,4	4,1

ihnen in der Gruppe vereinigten *ruber*-Stamm haben sie entwicklungs-
mäßig einen beträchtlichen Vorsprung. Besonders *Pr. pyridinus* und
piperidinus weisen ansehnliche Mycelgewichte auf. Die Nährlösung
wurde in ihren Kulturen zähflüssig und dunkelbraun, das p_H sehr stark
erhöht. Auch *Pr. anilinus* entwickelte sich gut. Er ist dem *ruber*-Stamm
um fast das Doppelte im Gewicht überlegen, hinter den beiden besten
Verwertern steht er allerdings weit zurück. Der Vertreter von *Pr. nico-*
tinus dagegen konnte keine gute Entwicklung erreichen. Auch *nicotinus*
V und VI, die zur Kontrolle ebenfalls in die gleiche Lösung geimpft
wurden, entwickelten sich nicht besser. Alle blieben hinter dem ver-
wandten *citreus*-Stamm zurück.

Unter den gesättigten zweibasischen Säuren waren besonders Oxal-
säure und Weinsäure zur Kultur der *Proactinomyceten* ungeeignet, was
keine Besonderheit darstellt, denn ihre Verwertbarkeit ist für viele
Mikroorganismen gering. Auffallend dagegen ist, daß die Bernstein-
säure, deren Spaltprodukte in den meisten Fällen leicht assimiliert
werden, ein so schlechtes Ergebnis aufwies. Dieses Ergebnis ist be-
sonders merkwürdig, weil die Bernsteinsäure sich für die verwandten
Mycobakterien als bestes Aufbaumaterial erwies. Für *Proactinomyceten*
ist sie aber scheinbar ganz ungeeignet und zwar auch für diejenigen
Stämme, die in der Essigsäure sehr hohe Mycelgewichte erreichten.
Hier konnte sich sogar der *ruber*-Stamm besser entwickeln. Nicht viel
günstiger schneidet die Citronensäure ab, was ebenfalls nicht mit
älteren und neueren Literaturangaben übereinstimmt (*Sonderhoff* und
Deffner), in denen die Citronensäure als sehr gutes Baumaterial be-
zeichnet wird. Auch hier treten die „Giftersetzer“ mit ihren Gewichts-
zahlen dem *ruber*-Stamm gegenüber nicht unerheblich zurück, ebenso
entwickelt sich *Pr. citreus* besser als in den übrigen Säuren und besser
als *Pr. nicotinus*.

Die Verwertbarkeit der organischen Säuren erwies sich also als
sehr beschränkt und bot manche Ergebnisse, die nicht ohne weiteres
erklärt werden können. Wenn aber in ihren Kulturen schon manche
Besonderheit auftrat, so stellt uns die Kultur der *Proactinomyceten* auf
Nährböden mit verschiedenen C-Quellen aus dem Gebiet der Saccharide

vor ein noch ungewohnteres Bild. Die Einzelheiten hierzu sind in der Tabelle IX zusammengestellt.

Im allgemeinen werden die Hexosen etwa gleich gut verwertet, mit Mannose wurden die höchsten Gewichte erreicht, die Galaktose wurde etwas schwächer ausgenutzt. Aber es fällt sofort die große Überlegenheit der Gewichtszahlen auf, die die drei „Giftersetzer“ aus der Gruppe der roten bis orangefarbenen Organismen gegenüber ihrem Verwandten, der die in ihrem Namen ausgedrückten Fähigkeiten nicht besitzt, aufweisen. Der *ruber*-Stamm erreichte z.B. mit Mannose nur etwas mehr als ein Drittel des Mycelgewichts, auf das es *Pr. piperidinus* brachte. Die drei Stämme müssen befähigt sein, die Saccharide mit großer Geschwindigkeit anzugreifen und ihre eigene Substanz sehr schnell aufzubauen. Ob diese Fähigkeit im Zusammenhang steht mit der Zersetzungsfähigkeit der Kohlenstoff-Stickstoff-Verbindung, nach der sie benannt sind, ist völlig unbekannt; zu einer Entscheidung hierüber wären eingehende Untersuchungen notwendig. Jedenfalls ist der Unterschied in der Ausnutzbarkeit der Kohlenstoffquelle durch die vier Vertreter der gelbroten Gruppe so bedeutend, daß er nicht übersehen werden kann. *Pr. nicotinus* besitzt offenbar keine besonderen Zersetzungs- und Verwertungsmöglichkeiten gegenüber den Zuckerarten; in den meisten Fällen blieb, wie in den organischen Säuren, sein Mycelgewicht sogar hinter dem von *Pr. citreus* zurück.

Bei den Disacchariden tritt uns das gleiche Bild entgegen. Unter ihnen wird Maltose am besten verwertet von den Stämmen der ersten Gruppe, Saccharose von denen der gelbgrünen Stämme. Im allgemeinen treten aber alle drei Biosen hinter der Ausnutzbarkeit der Monosen zurück, am wenigsten bei den „Giftsetzern“ der ersten Gruppe, wie aus den Gewichtszahlen deutlich hervorgeht, die auch bei allen Disacchariden erheblich höher liegen als die Mycelgewichte der übrigen Glieder der Reihe. Auch *Pr. ruber* konnte nur wenig Mycel bilden, ebenso steht der *nicotinus*-Stamm wesentlich zurück. Die Versuchsreihe mit Lactose als Energiequelle fällt nicht aus dem Rahmen der anderen Biosen heraus. *Krassilnikov* erwähnt, daß er einige Stämme isolierte, die mit Lactose besser wuchsen als mit anderen Zuckerarten. Anscheinend sind diese Stämme ziemlich selten. Ob sie in unseren Böden vorkommen, ist ungewiß; jedenfalls ist unter den hier untersuchten Stämmen keiner dieser Art.

Am überraschendsten ist aber das Bild der 7. Vertikalreihe der Tabelle IX. Raffinose ist für *Mycobakterien* eine so schlechte C-Quelle, daß die Gewichte der auf ihr gewachsenen Bakterien nicht festgestellt werden konnten (*v. Plotho*, 1942). Der bei den *Mycobakterien* zum Vergleich herangezogene *Proactinomycet* wuchs ebenfalls schlecht. Ob Raffinose für *Actinomyceten* verwertbar ist, ist mir nicht bekannt, *Lieske* machte keine Versuche mit ihr. Bei den hier besprochenen Versuchen war jedoch, was die Stämme *pyridinus*, *piperidinus* und *anilinus* betrifft, die Entwicklung weitaus besser als auf allen anderen Zucker-

Tabelle IX.

Name des Stammes	Monosaccharide						Disaccharide						Trisaccharide	
	Dextrose		Galaktose		Mannose		Saccharose		Maltose		Lactose		Raffinose	
	End- pH	Ge- wicht in mg	End- pH	Ge- wicht in mg	End- pH	Ge- wicht in mg	End- pH	Ge- wicht in mg	End- pH	Ge- wicht in mg	End- pH	Ge- wicht in mg	End- pH	Ge- wicht in mg
<i>Pr. ruber</i>	6,4	14,5	6,4	7,8	6,2	12,5	—	6,1	6,5	4,8	—	4,6	4,8	4,3
<i>Pr. pyridinus III</i>	4,7	25,8	4,0	20,6	4,5	27,0	—	9,5	4,1	15,3	4,8	12,4	4,8	47,9
<i>Pr. piperidinus II</i>	4,4	25,7	4,1	23,4	4,3	34,1	4,8	20,6	4,7	20,2	4,7	16,1	4,1	47,4
<i>Pr. anilinus II</i>	4,1	22,0	4,7	19,4	4,5	35,9	4,5	11,3	4,5	14,9	4,8	13,2	4,7	36,2
<i>Pr. flavus</i>	6,2	12,4	—	—	5,6	8,7	5,3	12,5	—	—	4,8	5,9	—	—
<i>Pr. citreus</i>	6,4	10,6	5,6	6,8	5,8	8,0	5,9	14,4	6,1	7,3	4,7	4,6	4,7	8,3
<i>Pr. nicotinus I</i>	6,2	11,7	6,0	4,0	6,2	7,5	5,4	11,3	5,4	4,0	4,7	4,3	4,7	7,7

arten¹. Die Entfaltung des *ruber*-Stammes dagegen ist durchaus nicht gut. Es wurden daraufhin Kontrollversuche mit *Pr. ruber*, Stamm 1 und 2 durchgeführt. Ihre Gewichtszahlen hielten sich alle in niedrigen Grenzen, Stamm 1 erreichte 7,7 mg Gewicht. Weiterhin wurden Kontrollversuche mit allen Stämmen von *Pr. pyridinus* und *piperidinus* gemacht. Sie ergaben zum Teil noch höhere Gewichtswerte. Eine Kultur von *pyridinus* II erreichte unter gleichen Bedingungen das Gewicht von 60,1 mg, und *piperidinus* III erzielte den Wert von 51,6 mg. Auch *Pr. citreus* und *nicotinus* wuchsen auf Raffinose verhältnismäßig gut, wobei wieder zu beachten ist, daß ihre Gewichtszahlen entsprechend dem Charakter ihres Stammes stets niedriger sein werden als die der anderen großen Gruppe. Immerhin erreichte auch hier der *nicotinus*-Stamm nicht das Gewicht von *Pr. citreus*, er dürfte der Kohlenstoffquelle gegenüber keine besonderen Aufschluß- und Verwertungsmöglichkeiten besitzen. Seine Verwandtschaft zu den „Giftzersetzern“ der gelbroten Gruppe scheint überhaupt sehr gering zu sein, was aus allem bisher Ermittelten, sowie auch aus einer weiter unten besprochenen Beobachtung hervorgeht. Es wird auf diese Verhältnisse, wie bereits erwähnt, in einer besonderen Arbeit ausführlich eingegangen werden.

Die systematische Gliederung der Proactinomyceten.

Wie aus den obigen Untersuchungen hervorgeht, unterscheiden sich die *Proactinomyceten* sowohl nach kulturellen, wie auch nach morphologischen und physiologischen Eigenschaften ziemlich scharf voneinander. Das führte dazu, daß verhältnismäßig früh eine systematische Gliederung an ihnen vorgenommen wurde. Schon *Jensen*, der als erster ihre Bedeutung und die Zusammenhänge unter einzelnen Stämmen erkannte, stellte ein System zu ihrer Gruppierung auf. Für ein solches kommt es in erster Linie auf Merkmale an, die scharf begrenzt, leicht erkennbar und vor allem konstant sind. Nach diesen Gesichtspunkten ist der Versuch *Jensens* leider wenig befriedigend, weil er als obersten Einteilungsgrund die Säurefestigkeit der Organismen heranzog. Die Säurefestigkeit stellt aber nach unseren heutigen Kenntnissen eine äußerst labile Eigenschaft dar.

Die Entfärbungsresistenz gegen Säuren ist abhängig von der Methode, nach der sie festgestellt wird. Es sollte daher bei jedem Urteil über Säurefestigkeit eines Organismus auch die Handhabung der Säurefestigkeitsprüfung mit angegeben werden. Bei den hier mitgeteilten Untersuchungen wurde das Carbofuchsin kalt auf den Objektträger gegossen und mehrere Male bis zur Blasenbildung erhitzt, die Entfärbungsdauer betrug 1 Minute, eine Nachfärbung wurde nicht vorgenommen. Weiterhin ist die Säureresistenz abhängig vom Alter der Kulturen. In ganz jungen Kulturen ist sie oft verhältnismäßig schwach, in alten fehlt sie häufig auch bei solchen Organismen, die im vollentwickelten Zustand eine gute Widerstandsfähigkeit gegen

¹ Es liegt natürlich die Möglichkeit vor, daß das Präparat noch Spuren von Wachstumsfaktoren enthielt; allerdings wachsen diese *ruber*-Stämme auf allen synthetischen Nährböden besonders gut.

Säureeinwirkung besitzen. Stark beeinflusst wird die Entfärbungsresistenz ferner durch die Zusammensetzung des Nährbodens, auf dem die geprüfte Kultur gewachsen war, und endlich ist der Dissoziationsgrad des Entfärbungsmittels von entscheidender Bedeutung für den Ausfall der Reaktion. Verschiedene Forscher (*Frei* und *Pockschischewsky*) haben die Ansicht vertreten, daß die *Art* der verwendeten Säure für den Ausfall der Entfärbung von Bedeutung sei. Demnach müßte entweder dem Anion der betreffenden Säure eine Bedeutung zukommen, oder das Säuremolekül als Ganzes müßte für das Ergebnis verantwortlich sein. Beim Vergleich der Entfärbungsintensitäten liefern aber alle Präparate eines bestimmten Objekts ein vollständig gleiches Bild, wenn sie mit Säuren gleicher Wasserstoffionenkonzentration behandelt waren, ganz unabhängig von der Art der verwendeten Säure. Werden aber die gleichen Säuren bei verschiedener H-Ionenkonzentration angewendet, so sind die Entfärbungsintensitäten ungleich. Demnach hängt die Säurefestigkeit nicht ab von der Art der Säure, sondern lediglich von ihrem Dissoziationsgrad.

Alle diese, die Säurefestigkeit beeinflussenden Faktoren sind auch bei *Proactinomyceten* wirksam, wie Tabelle X zeigt.

In der Tabelle X ist das Bild der Entfärbungsresistenz für zwei *Proactinomyces*-Stämme wiedergegeben, die je 4 Tage und 28 Tage alt waren, von drei verschiedenen Nährböden stammten und mit vier verschiedenen Entfärbungsmitteln behandelt wurden. Von diesen haben die *n* Essigsäure, die *n*/110 Schwefelsäure und die *n*/75 Salzsäure die gleiche Wasserstoffionenkonzentration, ein p_H von etwa 2,5, während die *n* Schwefelsäure bedeutend stärker ist. Es kommt in der Tabelle gut zum Ausdruck, daß die mit den drei erstgenannten Säuren entfärbten Präparate in allen Fällen das gleiche Bild der Säurefestigkeit der Organismen darbieten, daß die Entfärbungsintensität der mit *n* Schwefelsäure behandelten Objekte, entsprechend ihrer stärkeren H-Ionenkonzentration aber überall eine andere ist. Die schon früher ausgesprochene Vermutung, daß die Proportionalität zwischen Entfärbungsausfall und H-Ionenkonzentration der einwirkenden Säure ein Gesetz sei, das für alle Säuren gelte und alle säurefesten Organismen umfasse, gewinnt durch die erstmalige Hinzuziehung der *n*/75 Salzsäure wesentlich an Wahrscheinlichkeit. Weiterhin ist aus der Tabelle gut der Einfluß des Alters der Kulturen und der Zusammensetzung des Nährbodens auf den Ausfall der Reaktion erkennbar. Es braucht wohl nicht näher ausgeführt zu werden, daß die gleichen Versuche an allen Stämmen durchgeführt wurden und daß sie generell überall das gleiche Ergebnis hatten.

Bei der Labilität der Säurefestigkeit erscheint es also wenig zweckmäßig, auf ihr ein System aufzubauen. Außerdem besitzen die weiteren Merkmale, die *Jensen* zur Unterteilung heranzog, wie die Größe der Zellen, die Fadenlänge, das Vorkommen von bestimmten Involutionsformen, „Cysten“ wie er sagt, nicht ausreichende Bestimmtheit und Konstanz, um als grundlegende Merkmale einer systematischen Gliederung zu dienen. Trotzdem wurde der oberste Einteilungsgrund *Jensens* auch von *Waksman* übernommen, der 1940 für die Familie der *Actinomyceten* eine Klassifikation vorschlug, in der die *Proactino-*

Tabelle X. Säurefestigkeitsprüfung von *Pr. nicotinus* I und *anilinus* II. p_H 6,8, Temperatur 27°C.

[illegible]

myceten mit dem Bestimmungsschlüssel „teilweise säurefest“ oder „nicht säurefest“ eingereiht sind.

Auch in der letzten Ausgabe des diagnostischen Handbuches von *Bergey* werden zum ersten Male die *Proactinomyceten* als selbständige Gattung aufgestellt. Als obersten Einteilungsgrund gibt er, wie bereits erwähnt, die Bildung von Indigotin aus Indol an. Wie weit dieser Einteilungsgrund stichhaltig ist, kann nicht beurteilt werden. Die weiteren unterscheidenden Merkmale des Bestimmungsschlüssels sind aber wenig charakteristische und schwankende Eigenschaften, wie „lange Stäbchen oder Fäden“, dem „kurze Stäbchen, selten Fäden“ gegenübergestellt wird. Allerdings wird als Unterscheidungsgrund auch die Färbung angegeben, aber nur zwischen „orange bis dunkelrot“ gefärbten und „ungefärbten“ Stämmen unterschieden.

Den vorläufig glücklichsten Versuch zur Klassifizierung stellt ohne Frage das System von *Krassilnikov* dar. Er gliedert die *Proactinomyceten* nach morphologischen und physiologischen Eigenschaften und zieht als leicht erkennbares und sehr konstantes Merkmal ihre Färbung heran. Natürlich kann die Bildung eines bestimmten Pigments allein als entscheidendes Merkmal für eine systematische Gliederung nicht ausschlaggebend sein. Aber mit diesem, bis zu einem gewissen Grade äußerlichen und auf unseren künstlichen Nährböden vielleicht sogar zufälligen Merkmal verbinden sich in allen bekannten Fällen bei den *Proactinomyceten* bestimmte Eigenarten des Baues und der physiologischen Fähigkeiten, so daß aus der Färbung einer Kultur geradezu auf ihre Morphologie und manche ihrer physiologischen Eigenschaften geschlossen werden kann. Es wurde z. B., wie *Krassilnikov* betont, von ihm bei der Gruppe *ruber* nie ein Stamm gefunden, der Gelatine verflüssigte. Das trifft auch für die vorliegenden Untersuchungen zu.

Dennoch kann auch das System von *Krassilnikov* nur als ein vorläufiges bezeichnet werden, denn unter der großen Zahl der von ihm untersuchten Stämme gibt er keinen einzigen an, der mit besonderer Fähigkeit zum Abbau bestimmter Verbindungen ausgestattet war. Diese Fähigkeit aber ist, insbesondere wenn sie sich bezieht auf heterozyklisch gebundene Kohlenstoff-Stickstoffverbindungen, sicher von großer Bedeutung und muß in einem endgültigen System der *Proactinomyceten* berücksichtigt werden.

Unter den hier beschriebenen Stämmen befinden sich 15, die befähigt sind, Kohlenstoff-Stickstoff-Verbindungen anzugreifen, 13 von ihnen vermögen heterozyklisch gebundene Kohlenstoff-Stickstoff-Verbindungen zu zersetzen. Diese Fähigkeit ist bei jedem Stamm beschränkt auf jeweils eine bestimmte Verbindung, auf andere derartige Stoffe vermag der betreffende Stamm nicht einzuwirken. Heterozyklisch gebundener Kohlenstoff-Stickstoff liegt wahrscheinlich in den Humusstoffen des Bodens vor, deren schwere Angreifbarkeit durch Mikroorganismen möglicherweise auf diese Bindungsart zurückgeführt werden muß, wie *Rippel* wiederholt betonte. Es darf daher angenommen werden, daß sich *Proactinomyceten* mit Angreifvermögen gegenüber diesen heterozyklischen Verbindungen vorwiegend an solchen Orten

finden werden, an denen diese Verbindungen besonders häufig vorhanden sind. Diese Annahme erfährt geradezu eine Bestätigung durch die Tatsache, daß sich bei den Isolierungen für die obigen Untersuchungen ein sehr hoher Prozentsatz der Stämme, die Pyridin, Piperidin oder Nicotin angreifen können, in der Komposterde fand, einem Material, in dem sich Humusstoffe besonders reichlich ansammeln. Unter 10 mit ihr beimpften Ansätzen konnten aus jedem einzelnen ein oder mehrere derartige Stämme isoliert werden. Bei der Überprüfung stellte sich dann aber heraus, daß verschiedene miteinander identisch waren, so daß sie in der Tabelle I nur einmal aufgeführt sind. Die Fähigkeit zum Abbau der erwähnten organischen Verbindungen ist anscheinend eine sehr konstante Eigenschaft, sie blieb während zweijähriger Kulturdauer und häufiger Überimpfungen bei allen Stämmen unverändert. Durch sie scheinen, entsprechend der Konstitution der Humusstoffe, die Träger dieser Eigenschaften an den Umsetzungsprozessen im Boden maßgebend beteiligt zu sein.

Von den Stämmen mit besonderen Fähigkeiten besitzen die Pyridin und Piperidin angreifenden untereinander engere verwandtschaftliche Beziehungen. Ein Beweis dafür, daß ihre Stoffwechselumsätze in der gleichen Richtung verlaufen, liegt in der Bildung von Triphenylamin, das sich durch seinen auffälligen und unverkennbaren Geruch leicht bemerkbar macht. Beim Wachstum auf Trypsin-Glycerin-Agar entsteht wenige Tage nach der Impfung bei allen Pyridin- und Piperidin-Zersetzern und *nur* bei diesen ein mehr oder weniger starker Geruch nach Triphenylamin, der mit dem Älterwerden der Kulturen geringer wird, aber nie ganz verschwindet. Auch durch die starke Ausnutzbarkeit der Zuckerarten, der Essigsäure und verschiedener Stickstoffquellen, die sie mit *Pr. anilinus* gemeinsam haben, bekunden sie ihre engere Verwandtschaft untereinander. Mit den *ruber*-Stämmen ohne besondere Abbaufähigkeit sind sie entfernter verwandt. Dennoch haben sie auch mit ihnen manches Gemeinsame, das sich im Bau ihres Jugendmycels, in den Formen ihrer späteren Entwicklungsstadien, sowie in ihren fermentativen und sonstigen physiologischen Eigenschaften äußert. Ebenso weist ihre Färbung sie diesem Formenkreis zu. Sie wurden daher bei diesen Untersuchungen vorläufig dieser Gruppe zugeordnet.

Die Nicotin zersetzenden Stämme gehören einem vollständig anderen Typus an. Sie unterscheiden sich untereinander durch die Fähigkeit Substratfarbstoff zu bilden, durch ihre ungleich schnelle Entwicklung, die sich unter anderem in der Reaktion des Kulturmediums bemerkbar macht (Tabelle II), durch die Fadenbreite ihrer Stäbchen und die Durchmesser ihrer Dauerformen, sowie den Farbton ihrer Kolonien. Eng verbunden sind alle durch ihre Fähigkeit, Nicotin angreifen zu können. Mit den Pyridin- und Piperidin-Zersetzern haben sie in kultureller, morphologischer und physiologischer Hinsicht wenig Ähnlichkeit, stehen vielmehr der *citreus*-Gruppe nahe, der sie in den vorliegenden Untersuchungen daher vorläufig angeschlossen wurden.

Die Stellung der besprochenen Stämme in den Gruppen *ruber* und *citreus* muß aber durchaus als eine vorläufige angesehen werden. Die Fähigkeit zum Abbau bestimmter Verbindungen ist ein so wichtiger physiologischer Unterscheidungsgrund, daß er bei einer endgültigen Klassifizierung der *Proactinomyceten* nicht außer acht gelassen werden darf. Es erschien aber verfrüht, schon jetzt Vorschläge zur systematischen Einordnung zu machen, da es nicht ausgeschlossen sein dürfte, daß sich bald weitere Stämme mit Angreifbarkeit gegenüber anderen Kohlenstoff-Stickstoffverbindungen finden werden.

Zusammenfassung.

Es wurden 25, aus Böden verschiedener Herkunft isolierte Stämme von *Proactinomyceten* untersucht und ihre vorläufige systematische Einordnung in drei verschiedenen Gruppen durchgeführt.

Unter den Stämmen befinden sich 4, die Pyridin, 3, die Piperidin, 2, die Anilin und 6, die Nicotin zersetzen.

Die Organismen sind mannigfaltig pigmentiert, die Färbung tritt meistens als Eigenfarbe auf, in mehreren Stämmen wurde Carotin nachgewiesen. In einem Fall wird Substratfarbstoff gebildet.

Die Untersuchungen zur Morphologie wurden ausschließlich an Einzell-Kulturen vorgenommen. Bei allen Stämmen entsteht ein einzelliges Jugendmycel, das durch Querwandbildung in Stäbchen und Kokken zerfällt. Luftsporen wurden nie gebildet. Die Vermehrung erfolgt durch Entstehung ruhender Zellen, durch Knospung und Bildung von Dauerformen.

Auf Dextrosenährböden wird von allen Stämmen zu Beginn des Wachstums Säure gebildet, die als Milchsäure identifiziert wurde.

Die Stämme der ersten Gruppe bilden ein breiteres und längeres Mycel und entwickeln sich gut auf zahlreichen Substraten. Die Vertreter der 2. und besonders der 3. Gruppe besitzen ein zarteres Mycel und sind anspruchsvoller an den Nährboden, in fermentativen Fähigkeiten aber weit überlegen.

In synthetischen Nährlösungen wird $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ als beste N-Quelle ermittelt.

Organische Säuren als C-Quelle sind nur in geringer Zahl verwertbar, befriedigendes Wachstum fand nur auf Essigsäure statt. Die Pyridin-, Piperidin- und Anilin-Zersetzer gedeihen auf ihr besonders gut.

Unter den Zuckerarten wurden Monosen gut, Biosen mäßig, die Raffinose am besten ausgenutzt, von den Pyridin-, Piperidin- und Anilin-Zersetzern wesentlich besser als von allen übrigen Stämmen.

Die Säurefestigkeit ist abhängig vom Alter der Kulturen und der Zusammensetzung des Nährbodens; für ihren Grad ist die H-Ionenkonzentration der einwirkenden Säure, nicht ihre Art verantwortlich.

Literatur.

Ammon, R., u. W. Dirscherl, Fermente, Hormone, Vitamine. Leipzig, Thieme, 1938.

Beijerinck, M. W., u. A. van Delden, Centralbl. f. Bakt. II, **10**, 33, 1903. — Beijerinck, M. W., Folia Microb. **2**, 185, 1914. — Bergey, D. H., Manual of determinative Bacteriology, 5. Aufl. London, Baillière, Tindall u. Cox., 1933. — Bernhauer, K., Gärungschemisches Praktikum. Berlin, Springer, 1936. — Bokor, R., diese Zeitschr. **1**, 1, 1930. — Brockmann, H., Angew. Chemie **53**, 384, 1940. — Bucherer, H., Centralbl. f. Bakt. II, **105**, 166, 1942. — Derselbe, ebenda **105**, 445, 1943.

Caminiti, R., Centralbl. f. Bakt. I, **44**, 193, 1907. — Carter, J. M., u. E. G. Hastings, J. Bact. **29**, 503, 1935. — Colein, F., ebenda **30**, 301, 1935.

den Dooren de Jong, L. E., Centralbl. f. Bakt. II, **71**, 193, 1927.

Ebeling, R., diese Zeitschr. **9**, 1, 1938. — Ehrlich, F., Biochem. Zeitschr. **79**, 152, 1916. — Eppinger, H., Ziegl. Beitr. z. Path. Anat. **9**, 287, 1891.

Frey, W., u. N. Pockschischewsky, Centralbl. f. Bakt. I. Orig. **60**, 161, 1911.

Gray, P. H. H., u. H. G. Thornton, Centralbl. f. Bakt. II, **73**, 74, 1928. — Gruber, M., Arch. f. Hyg. **16**, Heft 1, 35, 1892.

Haas, E., Centralbl. f. Bakt. I, **40**, 180, 1906. — Henrici, A., u. E. Gardner, J. inf. Dis. **28**, 232, 1921. — Horvath, J. von, diese Zeitschr. **13**, 373, 1943.

Jensen, H. L., Proc. Lin. Soc. N. S. W. **56**, 79 u. 345, 1931. — Derselbe, ebenda **56**, 201, 1932. — Derselbe, ebenda **59**, 18, 1934.

Krassilnikov, N. A., Bull. Acad. Sc. URSS. Ser. biol. **1**, 51, 1938. — Kriss, A. E., Mikrob. **5**, 621, 1936. — Kriss, A. E., u. A. Koroniako, Mikrob. **8**, 522 u. 693, 1939.

Lieske, R., Morpholog. u. Physiolog. der Strahlenpilze (Actinomyceten). Leipzig, Borntraeger, 1921. — Lignières, R., u. I. Spitz, Arch. d. Parasit. **7**, 1930, 1906; Ref. Centralbl. f. Bakt. I, **37**, 416, 1906.

Meyer, A., Die Zelle der Bakterien. Jena, Fischer, 1912. — Molisch, H., Mikrochemie der Pflanzen, 2. Aufl., S. 250. Jena, Fischer, 1921.

Namysłowsky, B., Centralbl. f. Bakt. I. Orig., **62**, 564, 1912. — Nocard, M., Ann. Inst. Past. **2**, 293, 1888. — Novak, M., A. Milan u. A. Henrici, J. inf. Dis. **52**, 253, 1933.

Plotho, O. v., diese Zeitschr. **11**, 33, 1940. — Derselbe, ebenda **13**, 93, 1942.

Rippel, A., Blancks Handb. d. Bodenlehre **8**, 599. Berlin, Springer, 1931. — Derselbe, Der Forschungsdienst, Sonderheft **17**, 54, 1941. — Rippel-Baldes, A., A. Starc u. W. Köhler, diese Zeitschr. **13**, H. 4, 365, 1943.

Seifert, O., u. Fr. Müller, Taschenb. d. klin. Diagnostik, S. 127. Wiesbaden, Bergmann, 1915. — Söhngen, N. L., Centralbl. f. Bakt. II, **37**, 599, 1913. — Sonderhoff, R., u. H. Deffner, Liebigs Ann. **525**, 132, 1936. — Störmer, K., Centralbl. f. Bakt. II, **20**, 282, 1908.

Vallée, R., Ann. Inst. Past. **17**, 288, 1903.

Waksman, S. A., Soil. Sc. **8**, 71, 1919. — Derselbe, J. Bact. **39**, 549, 1940; Ref. Centralbl. f. Bakt. II, **105**, 269, 1942. — Willstaedt, H., Carotinoide, Bakterien- und Pilzfarbstoffe. Stuttgart, Enke, 1934. — Wittern, A., Centralbl. f. Bakt. II, **87**, 412, 1933. — Wolf, M., u. I. Israel, Arch. Path. Anat. **26**, 126, 1891.

Zur Systematik der Pilzgruppe *Penicillium* Link.

1. Mitteilung: Die Untersektion *Radiata* (in der Sektion *Velutina* der *Asymmetrica*).

Von

A. Niethammer.

(Botanisches Institut der Technischen Hochschule Stuttgart.)

Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 1. März 1945.)

In jüngster Zeit wurde der Pilzgruppe *Penicillium* Link besonders vom Gesichtspunkt der Antibiose ein größeres Interesse als bisher entgegengebracht. Es erscheint daher berechtigt, auch von systematisch-mykologischer Seite dieser Pilzgruppe erhöhte Aufmerksamkeit zu schenken, und damit für die chemisch-physiologischen Arbeiten mit *Penicillium*-Arten gewisse Grundlagen zu schaffen. In der vorliegenden ersten Mitteilung über dieses Thema wird zunächst über eine eingehendere Untersuchung der Untersektion *Radiata* berichtet, da dieser das *P. notatum* Fleming angehört, mit dessen Hilfe bekanntlich Penicillin gewonnen wird.

Die nachfolgende Untersuchung der *Radiata* erstreckt sich auf ihre Verbreitung in der Natur und vor allem auf ihre eingehendere morphologische Charakterisierung, um an Hand typischer Merkmale und Eigentümlichkeiten eine Bestimmung dieser Arten zu erleichtern. Zum Vergleich zogen wir Kulturen der *Baarnschen* Sammlung (C.B.S.) heran.

1. Verbreitung in der Natur und Gemeinschaften.

Mit Hilfe der üblichen mikrobiologischen Methoden wurden Organismengemeinschaften aus Blütennektar, sowie Erdproben gewonnen und zunächst auf Platten mit Bierwürzeagar studiert. Naturgemäß gibt diese Methode keine genaue Auskunft darüber, welche Gemeinschaften unmittelbar in der Natur vorliegen, doch erschien sie für die beabsichtigten Zwecke ausreichend. In folgendem werden einige Beispiele angeführt:

- Cytisus nigricans*: *P. chrysogenum* Thom., *Torula* sp.,
- Polygala major*: *P. citreo-roseum* Dierckx, *Candida* sp., *Phytomonas* sp.,
- Cornus sanguinea*: *P. chrysogenum* Thom., ohne andere Mikroorganismen,
- Echium vulgare*: *P. baculatum* Westl., *Dematium pullulans* de Bary, *Torula* sp.,
- Alectorolophus minor*: *P. notatum* Westl., *Dematium pullulans* de Bary, *Phytomonas* sp.,
- Veronica chamaedrys*: *P. baculatum* Westl., *P. citreo-roseum* Dierckx,
- Salvia verticillata*: *P. brunneo-rubrum* Dierckx, *P. cyaneo-fulvum* Biourge, *Torulopsis* sp., *Phytomonas* sp.,
- Salvia verticillata* (zweite Blüte): *P. citreo-roseum* Dierckx, *Candida Reukauffii* Grüss., *Phytomonas* sp.,

- Salvia pratensis*: *P. notatum* Westl., *Torula* sp.,
Salvia pratensis (zweite Blüte): *P. chrysogenum* Thom, ohne Begleitorganismen,
Salvia pratensis (dritte Blüte): *P. notatum* Westl., *Torulopsis* sp.,
Salvia pratensis (vierte Blüte): *P. chrysogenum* Thom, *Candida pulcherrima* (Lindner) Windisch,
Stachys alpina: *P. citreo-roseum* Dierckx, *Kloeckera* sp.,
Orchis purpurea: *P. notatum* Westl., *Pleurotus* sp.

Bei den Isolierungen aus dem Erdreich erwies sich die Verwendung von Zellulosestreifen mit physiologisch-saurer *Stapp*-Nährlösung (vgl. S. 62 am zweckmäßigsten. Im folgenden werden einige Beispiele angeführt:

- Erdprobe I.: *P. luteum* Zukal, *P. notatum* Westl., *Dematium pullulans* de Bary.
Erdprobe II.: *Fusarium bulbigenum* Cke et Mass; *P. luteo-viride* Biourge, *P. baculatum* Westl.
Erdprobe III.: *P. baculatum* Westl., *F. oxysporum* Schlechtendahl, *P. luteum* Zukal.
Erdprobe IV.: *P. citreo-roseum* Dierckx, *P. glaucum* Link, *Cladosporium herbarum* Pers., *P. luteum* Zukal.

Wie ersichtlich handelt es sich hier um Vergesellschaftungen mit anderen *Penicillien*, vor allem der Gruppe *Biverticillata-Symmetrica*; besonders *P. luteum* und *P. luteo-viride* finden sich häufig als Begleitorganismen. Dagegen fehlen stets die sonst so häufigen Gemeinschaften mit *Trichoderma Koningi* oder *T. lignorum*.

Zusammenfassend läßt sich über die Verbreitung der *Radiata* in der Natur sagen, daß die Arten *P. baculatum*, *cyaneo-fulvum*, *notatum* und *chrysogenum* häufig im Erdreich vorhanden sind, wobei es gleichgültig ist, ob es sich um bebautes Land oder Ödland handelt. Dieselben Arten sind auch im Nektar der höheren Pflanzen recht verbreitet. Gelegentlich glückten auch Isolierungen von Holzstücken, die unmittelbar dem Walde entnommen waren. Manchmal sind diese Arten auch als Luftkeime zu gewinnen. *P. cyaneo-fulvum* wurde einmal auch aus Käse isoliert. *P. griseo-roseum* ist sowohl im Erdreich, als auch in Blüten seltener zu finden. Einmal gelang auch eine Isolierung aus der Luft. *P. citreo-roseum* konnte häufig aus dem Erdreich und in einzelnen Fällen auch aus dem Nektar verschiedener Blüten gewonnen werden. Ähnliches gilt auch für *P. brunneo-rubrum*, doch ist darauf hinzuweisen, daß es des öfteren mit anderen Vertretern der Untersektion *Radiata* vergesellschaftet ist. *P. virescens*, *chlorophaeum* und *meleagrinum* sind viel seltener anzutreffen. Uns gelangen nur ganz gelegentlich Isolierungen aus dem Erdreich oder dem Nektar.

2. Physiologische Merkmale und Leistungen der *Radiata*.

a) Einfache Stoffwechselprodukte. Bei *P. notatum*, *P. baculatum* und *P. meleagrinum* wurde intensive Bildung nicht flüchtiger Säuren beobachtet, Alkoholbildung fehlt, der Atmungskoeffizient ist sehr niedrig, abweichend von anderen *Penicillium*-Arten; reichliche Bildung von Mannit

konnte festgestellt werden¹. Das Vermögen zur Bildung von Glykonsäure und Mannit aus Glykose wurde bei *P. chrysogenum* beobachtet². Der gleiche Pilz wurde sogar zur gärungstechnischen Herstellung von Glykonsäure empfohlen³ und erwies sich hierfür geeigneter als 50 andere geprüfte *Penicillium*-Arten⁴. Ferner wurde über die Isomerisierung von Fructose, Galaktose und Mannose zu Glykose und deren Überführung in Glykonsäure durch *P. chrysogenum* berichtet; dieser Pilz soll sogar aus d-Arabinose und d-Xylose kleine Mengen Glykonsäure bilden, wobei anzunehmen ist, daß zunächst Glykose synthetisiert wird⁵. Dagegen werden Dioxyceton und d,1-Glycerinaldehyd durch *P. chrysogenum* in Milchsäure übergeführt und auch aus Glykose soll in gewissen Mengen Milchsäure gebildet werden. Beim Abbau der Glykose wird Methylglyoxal als Zwischenprodukt gebildet⁵. — *P. chrysogenum* und eine dem *P. notatum* nahe verwandte Spezies erwiesen sich zur Bildung von Dimethyltellurid in einer K-Tellurit enthaltenden Brotkultur befähigt; in einem analogen, aber Na-Selenat oder -Selenit enthaltenden Nährboden entwickeln die gleichen Pilze Dimethylselenit⁶.

b) Farbstoffe. Durch *P. chrysogenum*-Stämme, *P. notatum* Westl. und *P. notatum* Fleming wird ein gelbes Pigment, Chrysogenin, dessen Konstitution ungeklärt blieb (neben einem alkali-löslichen Protein), in die Nährlösung abgeschieden⁷. Aus Kulturfiltraten des *P. citreo-roseum* Dierckx, wie auch aus dem Myzel, konnte ein zitronengelber Farbstoff, das Citreorosein (ein 4, 5, 7-Trioxo-2-oxymethyl-anthrachinon) gewonnen werden⁸. In Gegenwart von Borsäure erwiesen sich *P. notatum*, *P. chrysogenum* und *P. meleagrinum* zur Bildung eines leuchtendgelben, grün fluoreszierenden Farbstoffes, des Borocitrins, befähigt⁹.

Etwas näher studiert wurde die Farbstoffbildung durch *P. chrysogenum*. Thom¹⁰ weist auf die starke, stammweise bedingte Variabilität bei dieser Spezies hin. Er erwähnt, daß ein von ihm in den USA isolierter Stamm nicht mit dem von Biourge¹¹ in Belgien isolierten Stamm in der Beschreibung vollkommen übereinstimme. Die Angaben beziehen sich auf gleiche Nährböden. Ein deutlicher Unterschied besteht auch zwischen den Guttations-Tröpfchen: Thom bezeichnet helle als für die Spezies typisch, Biourge dagegen gelbe. Szilvinyi¹² beschreibt bei seinen Isolierungen aus dem Lunzer Gebiet auch verschiedene Stämme. Das Ausmaß der gelben Farbstoffabsonderung ist ungleich: je nach Stamm verschieden starke helle, gelbliche oder gelbe Guttationen. Einige Faktoren der Farbstoffbildung bei *P. chrysogenum* wurden von Delitsch¹³ studiert. Dabei bewährte sich Milchezucker wesentlich besser als Glykose, doch wird auch von diesem Autor auf gewisse sprunghafte Veränderungen des Pilzes besonders hinsichtlich der Bildung von Luftmyzel, Konidienträgern und Farbstoff hingewiesen, wodurch die Gewinnung vergleichbarer Beobachtungen erschwert wird.

¹ J. H. Birkinshaw, I. H. V. Charles, A. C. Hetherington u. H. Raistrick, Appendix von Ch. Thom: Phil. Transactions (B) **220**, 55 (1931).

² J. H. Birkinshaw u. H. Raistrick, ebenda **220**, 331 (1931).

³ O. E. May, H. T. Harrick, A. J. Moyer u. P. A. Wells, Ind. Eng. Chem. **26**, 575 (1934); vgl. auch A. P. 2.006.086 vom 24. 8. 1934, aus. 25. 6. 1935, C **1935**, II, 3592.

⁴ A. J. Moyer, O. E. May u. H. T. Harrick, Zbl. Bakt. II, **95**, 311 (1936).

⁵ C. Lenti, Giorn. Batteriol. Immunol. **24**, 56 (1940); C. **1940**, II, 2759.

⁶ M. L. Bird u. F. Challenger, J. chem. Soc. (London) **1939**, 163.

⁷ P. W. Clutterbuck, R. Lovell u. H. Raistrick, Biochem. J. **26**, 1907 (1932).

Eigene Beobachtungen zeigen, daß das Vermögen zur Farbstoffbildung bei den einzelnen Stämmen von *P. chrysogenum* recht unterschiedlich ist. Manche Stämme waren fast farblos, so beispielsweise eine vom C.B.S. Baarn bezogene Kultur. Von uns aus dem Nektar und dem Erdreich isolierte Stämme erwiesen sich in der Bildung von gelbem Farbstoff als sehr verschieden. Um vergleichbare Werte zu erlangen, wurden mit den Filtraten verschiedener Stämme quantitative Messungen des gelben Farbstoffes mit Hilfe des Tintometers ausgeführt.

Kultur auf *Czapek-Dox*-Lösung (0,3% NaNO_3 , 0,1% KH_2PO_4 , 0,05% KCl , 0,05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ und 0,001% FeSO_4 in Leitungswasser, entweder mit 2% Glykose oder 2% Milchezucker). Versuchsdauer 14 Tage bei 26°. Zum Vergleich wurde Voll-, Mager- und Trockenmilch geprüft. Dabei wurden folgende Ergebnisse gewonnen:

Kultur	Nährlösung	Farbwerte	
		orange	gelb
Nr. 313, Stamm Baarn C. B. S.	Glykose	0,10	1,9
	Milchezucker	0,10	0,3
	Vollmilch	0	0
	Magermilch	0	0
	Trockenmilch	0	0
Nr. 629, eigene Sammlung	Glykose	1,0	1,1
	Milchezucker	0,8	10,2
	Vollmilch	1,8	26,4
	Magermilch	1,6	16,8
	Trockenmilch	2,1	16,9
Nr. 260 eigene Sammlung	Glykose	2,3	8,2
	Milchezucker	1,0	11,0
	Vollmilch	2,7	24,3
	Magermilch	3,5	27,5
	Trockenmilch	2,3	14,7
Nr. 266 eigene Sammlung	Glykose	0,5	11,5
	Milchezucker	0,8	11,2
	Vollmilch	2,2	13,8
	Magermilch	3,0	20,5
	Trockenmilch	1,7	10,3
Nr. 232 eigene Sammlung	Glykose	0	0
	Milchezucker	0	0

Wie ersichtlich, zeigen die untersuchten Stämme, die gemäß ihren mikroskopischen und habituellen Merkmalen eindeutig als *P. chrysogenum* Thom identifiziert waren, sehr erhebliche Unterschiede in der

⁸ Th. Posternak u. J. P. Jakob, Helv. chim. Akta, **23**, 237 (1940).

⁹ R. Kuhn, Wiener Chemiker-Zeitung **46**, 1 (1943).

¹⁰ C. Thom, The Penicillia, London, 1930. Baillière, Tindall, Cox.

¹¹ Ph. Biourge, La Cellule, **33**, 1 (1923).

¹² Szilvinyi, von, Zbl. Bakteriologie. Parasitenkunde, Infektionskrankheiten,

103, 133, (1941).

¹³ H. Delitsch, Zbl. Bakteriologie. Parasitenkunde, Infektionskrankheiten, II., **106**, 337 (1944).

Tabelle I.

Mikroskopische Merkmale

Reihe		Typica			
Gemeinsame Merkmale		Sterigmen im oberen Drittel deutlich eingeschnürt, ein kleines Köpfchen aufweisend		Sterigmen zylindrisch, an der Spitze	
Spezies		<i>P. chrysogenum</i> Thom	<i>P. notatum</i> Westl.	<i>P. baculatum</i> Westl.	<i>P. brunneo-rubrum</i> Dierckx
Kondienträger	Anordnung und Aussehen	Oft mit Ansatz, der ein <i>Monoverticillium</i> trägt, typisch	im unteren Teil oft stark verzweigt	manchmal in Art eines <i>Monoverz.</i> , oft Rami vorhanden. Septen.	deutliche Verzweigungen. Ansatzstück als <i>Monoverz.</i> möglich
	Ausmaße	300×4	750×4	$80-800 \times 3,4-5$	$300 \times 3,5$
Penicillus	Ausmaße	$50 \times 3,5$	$45-135 \times 4$	$50-60 \times 3,5$	$40-70 \times 3,5$
Rami	Anordnung	paarweise asymm.	meist paarweise asymm.	unregelmäßig, paarweise, selten quirlig	paarweise asymm., körnig, auch fehlend
	Anzahl	2	2, selten 3	2, selten 3	meist 2
	Ausmaße	$14-16 \times 3-3,5$	$15-25$, selten 40×3	$15-20-30-40 \times 2,2-4$	$23-60 \times 3$
Metulae	Anordnung	asymm.	asymm.	asymm.	stets eine asymmetrisch angeordnet
	Anzahl	2, auch 3-4	meist 2-3	2-3, auch 4	2-4
	Ausmaße	$9-14 \times 3-3,5$	$10,5-14 \times 3-4,6$	$10-18 \times 3,4-3,6$	$10-20 \times 3-3,5$
Sterigmen	Aussehen	eckig, derb	derb	derb, abgerundet	derb, abgerundet
	Anzahl	3, auch 2 oder 4	3, selten 4 oder 5	3	3-4, selten 5
	Ausmaße	$8-9 \times 3,5$	$8-12 \times 2,5-3$	$8-10 \times 2-2,5$	$9-15 \times 3,2-3,5$
Kondien	Form	rundlich	rundlich	elliptisch	elliptisch
	Ausmaße	$2,5-3$	$2,6 \times 3,2$	$3-4,2 \times 3-3,6$	$3-3,5 \times 2,5-3$

Tabelle I.

iata auf Czapek-Agar.

			Elliptica		Maxima
förmig, nur schnürt			Sterigmen zylindrisch, gleichmäßig stark; Konidien elliptisch		Sterigmen auffallend lang, etwas eingeschnürt
<i>P. anaeo-fulvum</i> Biourge	<i>P. griseo-roseum</i> Dierckx	<i>P. citreo-roseum</i> Dierckx	<i>P. chlorophaeum</i> Biourge	<i>P. virescens</i> Bain	<i>P. meleagrinum</i> Biourge
anachmal wie bei <i>Monovert.</i>	oft wie bei <i>Monovert.</i>	oft mit einzelnen Abzweigungen	sehr häufig wie <i>Monovert.</i>	sehr kräftig, rauh, Form u. Größe wechselnd	oft mit Abzweigungen, selten wie bei <i>Monovert.</i>
$\times 2,5-3,5$	500×4	350×4	$30-90 \times 2,4$	$60-160 \times 2,5$	$150-200 \times 3-4$
$\times 2,5-3$	$60 \times 3,5$	$35-50 \times 3,5$ —4	$20-60 \times 2,4$	$30-50 \times 2,5$	20—25 ohne, 40 mit Rami
mm. vergrößert, können fehlen	paarweise asymm.	stets asymm.	paarweise asymm., oft fehlend	paarweise asymm., derb, kurz	einer stets asymm.; divergierend
2—3	2	2—3	2	2	2—3, können auch fehlen
$30 \times 3,5$	$20-30 \times 3,5$	$12-30 \times 2,5-3,5$	$4,5-20 \times 3-3,5$	$13,5-16 \times 3,5$	$10-15 \times 3,5$
büschelförmig	terminal kranzförmig	eine asymm., sonst oft symm	asymm.	kranzförmig	büschelförmig
3	3—4—5	2—3, selten 4	2—3	4—5	2—4
$10 \times 2,5-3$	$10-12 \times 3$	$10-12 \times 2-2,6$	$3-12 \times 1-2$	$9-9,5 \times 1,8$	$11-14 \times 2,5-3$
schmal, oben sich verbreiternd	eckig, derb	derb, an der Spitze rundlich	relativ lang und schmal	eckig, derb, oben etwas abgerundet	lang, schmal
auch 3	2—3—5, selten 7	meist 3	3—4—5	meist 3	2—4
10×3	$7-10 \times 3$	$7,5-11 \times 2,4-3$	$6-10 \times 1,5-2$	$8-9 \times 2$	$7-12 \times 2,5$
rundlich	rundlich	rund bis rundlich	rundlich	rundlich	länglich bis oval
5—4	3—4	2,8—3,8	2,2—3,8	3,5	3,5—4

Tabelle IIa.

Habituelle (makroskopische)

Reihe	Typica			
Gemeinsame Merkmale	vgl. mikroskopische Merkmale		Pilzrasen meist mehr flochsig; Konidiendecke türkis-farbig, auch gelborange, bei <i>P. baculatum</i> oft fadenförmig	
Spezies	<i>P. chrysogenum</i> Thom	<i>P. notatum</i> Westl.	<i>P. baculatum</i> Westl.	<i>P. brunneo-rubrum</i> Dierckx
Pilzrasen Aussehen	zunächst samtig, bald Überwachungen u. Verknäuelungen	dichter in die Höhe strebender Rasen, Decke unregelmäßig	Kolonie sehr regelmäßig; locker, samtig bis leicht wollig	locker, samtig bis leicht wollig. Typische Zonenbildungen sind buckelförmige Erhöhungen
Rand der Kolonie	wenig deutlich, typischer Rand selten	oft weißer Rand bei manchen Stämmen fehlend	sehr deutlich und regelmäßig (typisch)	schmal, zunächst deutlich, später überwachend
Radienbildung	wenig deutlich	auf der Unterseite beginnend, sehr derb	erst auf der Unterseite, dann auch auf der Oberseite	anfangs sehr deutlich, später mit sehr deutlichen Zonenbildungen (typisch)
Farbe der Konidiendecke	grün bis blaugrün, oft mit hellen Tönen	blaugrün	blaugrün	blaugrün bis türkis-farbig
Farbe der Unterseite	farblos, gelblich, rotbraun	gelb, bei manchen Stämmen rotgelb	hell bis cremefarben	erst gelblich, dann braungelblich
Myzelüberwachungen	sehr häufig, besonders auf sauren Medien, weiß bis rosa	fehlen	fehlen	häufig hellbraun bis braun
Farbstoffdiffusion	fehlt bei Gruppe a, deutlich gelb bei Gruppe b	fehlt	fehlt	häufig gelblich
Guttation u. Farbe derselben	Gruppe a: hell Gruppe b: gelb	farblos bis leicht gelb	keine oder schwach	häufig, gelblich Tropfen

Normalboden (NB) nach Sopp und Asparaginagar (AA) nach Woeltje

Tabelle IIa.

kmale der Radiata.

			Elliptica		Maxima
g, oft mit gleichmäßigem weißen laugrün; Unterseite gelb, gelbbraun arbstoffdiffusion, typische Radien, ig			Stets samtige, Decken ohne Über- wachsungen mit breitem weißem Rand, der später mit Konidien überdeckt wird; Konidienbildung oft sehr lang- sam, Radien schwach ausgebildet		vgl. unten
<i>P. ganeo-fulvum</i> Biourge	<i>P. griseo-roseum</i> Dierckx	<i>P. citreo-roseum</i> Dierckx	<i>P. chlorophaeum</i> Biourge	<i>P. virescens</i> Bain	<i>P. meleagrinum</i> Biourge
ne Decke, hr samtig s flockig	flockig, sam- tig, weniger dicht	flockig, samtig	sehr dicht samtig, zu- nächst schnee- weißes Myzel (typisch)	samtig	wollig, samtig mit Über- wachsungen
nicht rein ß, unregel- mäßig	weißer Streifen	weiß, un- regelmäßig	breite, weiße Randzone infol- ge unregelmäs- siger Konidien- bildung	breite, weiße Randzone in- folge langsa- mer Konidien- bildung	dunkel verfärbt
fangs oft r gering, äter feine radialfalten	nicht sehr deutlich	feine Fälte- lung der Unterseite (typisch)	kaum erkennbar	fächerförmig	tritt nur zögernd ein
leuchtend blau	graugrün	blaugrün	blaugrün	blaugrün, später grau- grün	dunkelgrün in verschie- dener Tönung, Farbenwechsel typisch
ß intensiv b, AA oft ll je nach Stamm	gelbbraun mit rosa Einschlüssen	gelb, später rosa Ein- schlüsse	hell bis schwach gelb	grünlich-gelb getönt, später gelb	grün
ß typisch	vorhanden, grau bis rosa	gelegentlich hell	fehlen	fehlen	vorhanden, grün bis weiß
fehlt	fehlt	schwach	fehlt	fehlt	fehlt
ne Tropfen	hell bis gelblich	gelbliche Tropfen	helle Tropfen	schwach, helle Tropfen	schwach helle Tropfen,

Tabelle IIb.

Habituelle (makroskopische Fortsetzu

Reihe			Typica			
Spezies			<i>P. chrysogenum</i> Thom	<i>P. notatum</i> Westl.	<i>P. baculatum</i> Westl.	<i>P. brunneo-rubrum</i> Dierckx
Milch (etwa nach 10 Tagen)	Myzel	O. S.	cremefarben	weiß	hell	hell
		Ko. D.	grün	blaugrün	grün	grün
		U. S.	hell bis gelb	gelb	hell	cremefarben später gelblich
		R.	weiß	gelb	hell	hell
	Flüssigkeit		goldgelb oder hell; Kasein- ausfällung	hell bis schwach gelb	schwach gelblich	gelbbraun
Zellulose- streifen (etwa nach 3 Wo- chen)	phy- siol. sauer	P. D.	dünn, einge- senkt, grau- grün	dünn, lose, grün, samtig	dünn, blaugrün	sehr dick, blaugrün, samtig
	phy- siol. alk.	W. B.	sehr dünn, eingesenkt, samtig	sehr dünn, samtig	dünn, einge- senkt, samtig	dünn, samtig
		U. S.	gelb	farblos	leicht gelblich	gelb
		So. M.	Fl. hell			gelbe F.
Brotbrösel (etwa nach 10 Tagen)		Ko. D.	blaugrün	blaugrün	typ. blaugrün	grün
		So. M.				
Kartoffel- scheiben (etwa nach 1 Woche)		Ko. D.	kräftig, grün	graugrün, dick, glatt	blaugrün	grün
		So. M.	R. meist gelb		R. typisch	Üb. braun
Woeltje-Lösung (etwa nach 1 Woche)		So. M.	U. S. hell, R. braun, typisch	U. S. sehr derb gefaltet, R. gelblich	U. S. hell, R. hell	U. S. schwach hell-braun
		U. S.	hell bis gelb	gelblich	hellbraun	hellbraun
Rauilin-Gelatine (etwa nach 1 Woche)		N. B.	häufig gelb, alkalisch	gelb, sauer	gelbbraun	gelbbraun
		Verfl. *)	ja	ja, rasch	nein	ja, langsam
Geruch				unangenehm, schimmlig	vielfach ange- nehm, obstartig	

*) nach 14 Tagen.

Abkürzungen: O. S. = Oberseite Ko. = Konidien
 U. S. = Unterseite Ko. D. = Konidien
 R. = Rand Üb. = Überwachungen

Tabelle IIb.

Phale der Radiata.

etzung

			Elliptica		Maxima
<i>P. neo-fulvum</i> Biourge	<i>P. griseo-roseum</i> Dierckx	<i>P. citreo-roseum</i> Dierckx	<i>P. chlorophaeum</i> Biourge	<i>P. virescens</i> Bain	<i>P. meleagrimum</i> Biourge
hell	hell	cremefarben	weiß	hell	hell
graugrün	graugrün	grün	hellgrün	grün	blaugrün
gelb	gelblich	gelb	weiß	weiß	hell
hell	hell	rosa	hell	hell	hell
rk gelb	gelb	gelborange (sehr typisch)	hell	hell	hell
schwach graugrün	sehr dünn, samtig	dicht, grün, samtig	dicht, weiß	schwach, grün, flaumig,	dunkelgrün, samtig
r dünn	sehr dünn, blaugrün	dünn, samtig	sehr schwach	schwach, grün, samtig	kräftig
gelb	gelb	farblos	farblos	gelb	farblos
	gelber Ring	gelbe F. A.			gelber Ring
melblau	graugrün	grau	Ko-bildg. schwach	grün	grün
	R. gelb, Üb. grau, stark	leicht gelbe F. A.			
melblau	grün	grün	Ko-bildg. schwach	graugrün, samtig	grüne Tö- nung, samtig
unregel- mäßig	Üb. grau	F. A. gelb u. rosa	P. D. dicht, weiß-wollig		
und R. siv gelb pisch	Ko. D. blau- grün, R. gelb	Fl. stark gelb	P. D. hell, Ko. blaugrün Fl. hell	P. D. hell Fl. hell	P. D. hell Ko. grün Fl. hell
braunrot	hell	gelb u. rosa	hell	hell	gelb u. weiß
braun	hell	hell	hell	hell	hell
ein	nein	nein	nein	nein	nein

Flüssigkeit F. A. = Farbstoffausscheidung W. B. = Wachstumsbild
 Nährboden (in das Substrat) So. M. = Sonstige Merkmale
 Verflüssigung P. D. = Pilzdecke

Farbstoffbildung. Dabei ist aber nur in einem einzigen Fall eine kleine Überlegenheit des Milchzuckers gegenüber Glykose feststellbar. Das von *Delitsch* an nur einem Stamm ermittelte Ergebnis darf daher nicht verallgemeinert werden. Sehr deutlich ist dagegen fast stets die Überlegenheit der Milch hinsichtlich der Intensität der Farbstoffbildung, worauf bereits *Thom* aufmerksam gemacht hatte. Übrigens ergaben bereits Vorversuche, daß es mit Hilfe der Einsporen-Technik gelingt, aus farbstoff-bildenden Stämmen farblose Varianten herauszuzüchten und umgekehrt. Hierüber wird später noch im Zusammenhang zu berichten sein.

c) Zellinhaltsstoffe. Bei *P. chrysogenum* wurden 1,6% Sterine im Trockenmyzel nachgewiesen¹⁴. Bei *P. cyaneo-fulvum* wurden 0,38% Sterine, 8,2% Lipide und 21,9% Rohprotein im Trockenmyzel aufgefunden¹⁵. Wir selbst konnten bei *P. cyaneo-fulvum* in der Schüttelkultur¹⁶ 11,9% Fett und 18,06% Rohprotein und bei Herabsetzung der Nährsalzgabe auf die Hälfte 20,8% Fett und 12,7% Rohprotein im Trockenmyzel ermitteln.

d) Enzymsystem. Glykose-aerodehydrase wird durch *P. notatum* Fleming in das Nährmedium secerniert, wie von mehreren Autoren festgestellt werden konnte. Das als Flavoproteid anzusehende Ferment wurde auch als Notatin¹⁷ oder Penicillin B¹⁸ bezeichnet und ist wohl auch mit dem gleichfalls aus *P. notatum*-Kulturen gewonnenen Penatin¹⁹ identisch²⁰, sowie mit der bereits seit langem bekannten Glykose-oxydase von *Müller*²¹. Die mehr baktericide als bakteriostatische Wirkung dieser Substanz in Gegenwart von Glykose scheint hauptsächlich auf der Bildung von biogenem H_2O_2 zu beruhen²⁰. — In *P. chrysogenum* ist gleichfalls Glykose-aerodehydrase enthalten, die Glykose in Glykonsäure überführt⁵. Ferner wurde in dem Pilz das Vorhandensein eines Isomerase-Systems wahrscheinlich gemacht, das Fructose, Galaktose und Mannose in Glykose überführt. Schließlich ließen sich in *P. chrysogenum* Saccharase, α - und β -Glykosidase und Amylase nachweisen⁵.

e) Penicillin. Die Bildung dieses bekannten Bakterienhemmstoffes durch *P. notatum* Fleming wurde bereits eingangs erwähnt.

¹⁴ L. M. Pruess, H. J. Goricca u. H. C. Green, Biochem. Zs. **246**, 407 (1932).

¹⁵ L. M. Pruess, E. G. Eichinger u. W. H. Peterson, Zbl. Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten II, **89**, 370 (1934).

¹⁶ Versuchsansatz: 1% Rohrzucker, 0,064% Natriumnitrat, 0,025% saures Kaliumphosphat und 0,025% Magnesiumsulfat. Vgl. dazu K. Bernhauer u. J. Rauch, Biochem. Zs., im Druck.

¹⁷ H. Raistrick u. Mitarbeiter, Nature (London) **150**, 635 (1942).

¹⁸ Doisy u. Mitarbeiter, J. Biol. Chem. **147**, 47 (1943), **148**, 365 (1943).

¹⁹ Kocholaty, J. Bact. **44**, 142 (1942).

²⁰ J. H. Birkinshaw u. H. Raistrick, J. Biol. Chem. **148**, 459 (1943).

²¹ Vgl. dazu J. Hirsch, Istanbul Seririyati **25**, Nr. 8 (1943).

²² R. Westling, Arkiv f. Bot. **11**, 1 (1911).

²³ O. J. Olsen Sopp, Videnskapsselskapets Skrifter I. Mat.-Naturw. Kl. Nr. 11 (1912).

²⁴ A. Fleming, Brit. Journ. of experiment. Path. **10**, 226 (1929).

²⁵ Derselbe, J. Path. Bact. **35**, 381 (1932).

²⁶ C. Stapp u. H. Bortels, Zbl. Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten II, **90**, 28 (1934).

3. Kennzeichnung der einzelnen Reihen und Arten.

Gemeinsame Merkmale der *Radiata*: Unter Berücksichtigung der von *Thom*¹⁰ und *Biourge*¹¹ wiedergegebenen typischen Merkmale sowie vor allem der eigenen Erfahrungen mit über 90 selbst isolierten *Radiata*-Stämmen sind folgende mikroskopische und makroskopische Merkmale für die *Radiata* kennzeichnend:

Charakteristisch für das mikroskopische Bild ist zunächst der Aufbau und die Verzweigung des Konidienträgers, der wie auch sonst bei der Gruppe *Asymmetricum* aus mehreren Stockwerken besteht, doch müssen nicht immer alle vorhanden sein. Alle Verzweigungen oder zumindest Teile derselben erfolgen asymmetrisch (zum Unterschied von der Gruppe *Symmetricum*, bei der der Konidienträger außerdem nur aus zwei bis drei Stockwerken besteht). Das charakteristische mikroskopische Bild ist schematisch in Abb. 1 wiedergegeben. Manchmal ist bei den *Radiata* allerdings neben der be-

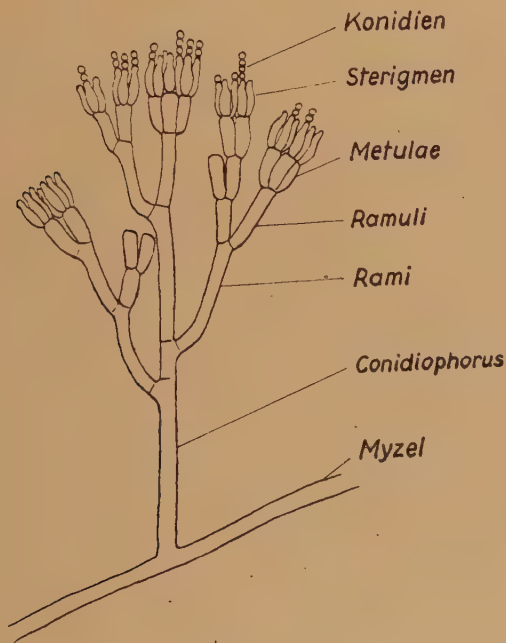


Abb. 1. *Penicillium*, *Radiata*-Gruppe, typisches mikroskopisches Bild des Konidienträgers.

schriebenen Anordnung auch nur ein Stockwerk ausgebildet, wie bei der Gruppe *Monoverticillium*. Für das Studium des mikroskopischen Bildes eignet sich sehr gut die Züchtung der Pilze auf *Czapek*-Agar (vgl. S. 61). Das mikroskopische Bild allein reicht zur Einreihung einer *Penicillium*-Form in die Untersektion *Radiata* allerdings nicht aus,

wohl aber zur Kennzeichnung eines Pilzes als Vertreter der Gruppe *Asymmetricum*.

Unter Berücksichtigung des Habitusbildes ist bei der Gruppe *Asymmetricum* eine samtige, wollige oder gebündelte Ausbildung der Kolonie zu beobachten. Die Untersektion *Radiata* gehört zu den samtigen Arten (Sektion *Velutina*). Typisch und namensgebend ist für dieselbe die Ausbildung von Radialfalten auf der Ober- oder Unterseite der Kolonie, vielfach auch auf beiden. Zur Feststellung der makroskopischen Merkmale der Kolonie dienen am besten der Normalnährboden nach *Sopp* und der Asparagin-Agar nach *Woeltje* (vgl. S. 00).

Gliederung der *Radiata* in Typenreihen und Bestimmung der Arten. Es sei nachdrücklichst betont, daß zur mikroskopischen wie auch makroskopischen Kennzeichnung der Arten stets ganz bestimmte Nährböden verwendet werden müssen, um einen Vergleich und damit eine einwandfreie Bestimmung zu ermöglichen. Leider sind die Untersuchungen von *Westling*²², *Sopp*²³, *Thom*¹⁰ und *Biourge*¹¹ immer wieder auf anderen Substraten durchgeführt, so daß ein unmittelbarer Vergleich schwierig ist. Sehr wichtig für die Kennzeichnung der Arten ist sodann die Berücksichtigung der Farben des Myzels, der Konidiendecke sowie der Unterseite der Kultur. Auch Farbstoffabscheidungen in das Substrat sind vielfach charakteristisch. Für diese Beobachtungen verwendet man zweckmäßigerweise *Woeltjes* Asparagin-Agar, *Woeltjes* Nährlösung, sowie *Raulin*-Gelatine (Zusammensetzung vgl. S. 62). In manchen Fällen ist auch das Wachstumsbild in Milch, auf angefeuchteten Brotkröseln, sowie auf Zellulosestreifen in physiologisch-saurer oder physiologisch-alkalischer Nährlösung nach *Stapp* kennzeichnend, wobei in der Regel gelbe bis braune Verfärbungen verschiedenster Tönung auftreten.

Nach unseren Beobachtungen lassen sich nun die Vertreter der Untersektion *Radiata* in einige Reihen gliedern, die durch gemeinsame mikroskopische und makroskopische Merkmale charakterisiert sind. Diese Gliederung ergibt sich zunächst aus der Form der Sterigmen, wie aus der Abb. 2 ersichtlich ist. Die gemeinsamen mikroskopischen Merkmale sind in Tabelle I, die gemeinsamen makroskopischen Merkmale

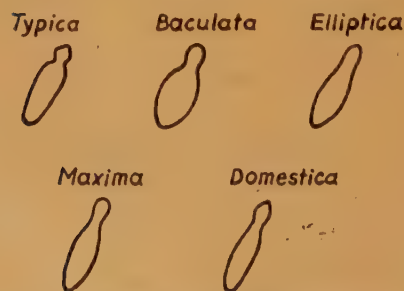


Abb. 2. *Penicillium*, Formen der Sterigmen.

der einzelnen Reihen in den Tabellen IIa und b angeführt. Ferner sind in den drei Tabellen alle für die einzelnen Arten charakteristischen Merkmale in übersichtlicher Form wiedergegeben, so daß eine Unterscheidung ohne Schwierigkeiten möglich ist. Diese Tabellen können daher auch als Schlüssel zur Bestimmung der angeführten Arten benutzt werden.

In den Zeichnungen der Abb. 3—6 sind einige typische Beispiele für die Anordnung der Konidienträger, deren Verzweigung, das Aussehen der Sterigmen und andere mikroskopische Merkmale dargestellt. Auf die Beigabe von Farbaufnahmen mußte verzichtet werden.

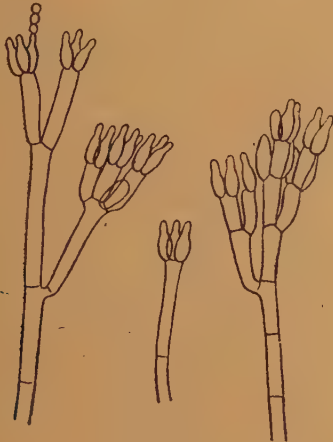


Abb. 3



Abb. 4



Abb. 5

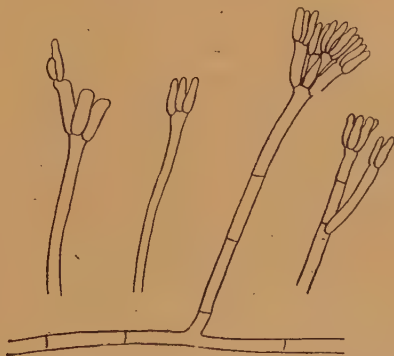


Abb. 6

Abb. 3 bis 6: Verschiedene Konidienträger bei *Penicillium*.

Es sei noch betont, daß unsere Untersuchungen an insgesamt 93 *Radiata*-Stämmen vorgenommen wurden, um den gemachten Beobachtungen und Schlußfolgerungen durch diese breite Fundierung eine möglichste Sicherheit und Beweiskraft zu verleihen. Im einzelnen wurden geprüft: 15 Stämme *P. chrysogenum* Thom, 19 *P. notatum* Westl., 16 *P. baculatum* Westl., 11 *P. brunneo-rubrum* Dierckx, 13 *P. cyaneo-fulvum* Biourge, 4 *P. griseo-roseum* Dierckx, 8 *P. citreo-roseum* Dierckx, 3 *P. chlorophaeum* Biourge, 3 *P. virescens* Bain und 1 *P. meleagridum* Biourge. Dabei wurden naturgemäß

mancherlei Stammesunterschiede beobachtet. Diese beziehen sich teils auf die mikroskopischen Merkmale, vor allem aber auf das Habitusbild. Des öfteren treten auch Übergangsformen auf. Bei manchen Stämmen ist es daher recht schwierig, eine endgültige Entscheidung über die Zugehörigkeit zu einer bestimmten Art zu fällen. Dazu kommt, daß manche morphologischen wie auch physiologischen Merkmale einer starken Variabilität unterliegen. Eine Klärung der zahlreichen noch offen gebliebenen Fragen wäre von breit angelegten Untersuchungen unter Berücksichtigung physiologischer und genetischer Gesichtspunkte und unter Benützung der Einsporentchnik zu erwarten.

Im folgenden werden noch die zur Unterscheidung der einzelnen Arten besonders typischen Merkmale zusammengefaßt:

Reihe *Typica*:

P. chrysogenum Thom: Konidienträger oft mit einem Ansatz, der ein *Monoverticillium* trägt. Die Kolonie in *Woeltje*-Lösung besitzt einen braunen Rand.

P. notatum Westl.: Unangenehmer Schimmelgeruch.

Reihe *Baculata*:

P. baculatum Westl.: Rand der Kolonie sehr deutlich und regelmäßig, angenehmer obstartiger Geruch der Kultur.

P. brunneo-rubrum Dierckx: Radienbildung anfangs schwach, später mit sehr deutlicher Zonenbildung.

P. cyaneo-fulvum Biourge: Weiße Myzelüberwachsungen, Rand und Unterseite der Kolonie in *Woeltje*-Lösung intensiv gelb, Unterseite der Kolonie auf *Raulin*-Gelatine rotbraun ohne Radien.

P. griseo-roseum Dierckx: Auf Brotbröseln grün-graue Konidiendecke mit gelbem Rand, dichte Überwachsungen, weiß und grau.

P. citreo-roseum Dierckx: Feine Fältelung der Unterseite auf Normalnährboden.

Reihe *Elliptica*:

P. chlorophaeum Biourge: Im Anfangsstadium schneeweißes Myzel auf Normalnährboden.

P. virescens Bain: Auf Normalnährboden große fächerartige Faltung der graugrünen Konidiendecke.

Reihe *Maxima*:

P. meleagrinum Biourge: In der Konidiendecke Wechsel dunkel- und hellgrüner Zonen.

Zur Typenreihe *Baculata* könnte auch *P. Westlingi* Zal. gestellt werden, das auf festen Substraten deutliche Radien bildet.

Zur Typenreihe *Elliptica* gehört auch *P. roseo-citreum* Biourge, von dem wir aber keinen Stamm besaßen.

Gegebenenfalls könnte als weitere Reihe der Typ *Domestica* angeführt werden, der jene Arten enthalten würde, die nicht in der Natur vorkommen, sondern lediglich im Laboratorium erhältlich sind. Zu diesem Typ könnte das *P. rubrum* Graßberger-Stoll eingereiht werden, das von Biourge¹¹ zu den *Radiata* gestellt wird. Thom¹⁰ führt es allerdings nicht an dieser Stelle an. Ferner könnte gegebenenfalls das *P. notatum* Fleming als Vertreter

dieser Reihe genannt werden, dessen Beschreibung bisher allerdings noch mangelhaft ist, so daß eine endgültige Einreihung nicht möglich erscheint.

P. rubrum Graßberger-Stoll. Das mikroskopische Bild bietet keine besonderen Anhaltspunkte. Die Kolonien sind sehr dicht samtig. Typisch für die Spezies ist die Absonderung eines roten, leicht diffundierenden Farbstoffes. Ein derartiger Farbstoff ist bei den übrigen Vertretern dieser Untersektion nicht zu beobachten.

P. notatum Fleming²⁴. Eine genaue botanische Beschreibung des von Fleming isolierten Pilzes liegt nicht vor. Der Entdecker selbst bezeichnete ihn zunächst als *P. rubrum* Biourge (1929). Später (1932)²⁵ wurde er als *P. notatum* Fleming charakterisiert. Die wenigen Beschreibungen, welche bei Fleming über diesen Pilz vorliegen, wollen wir zusammenfassen. Genaue feste Nährböden werden von dem Autor nicht angegeben. Es wird nur berichtet, daß rasch eine feste weiße Masse gebildet wird, nach wenigen Tagen erscheinen die Konidien, welche erst dunkelgrün, dann schwarzgrün sind. Typisch ist die Absonderung eines gelb-roten Farbstoffes, der in das Substrat diffundiert. Möglicherweise ist der Pilz auf dem Nährboden nach Sabaurand gezogen worden, welchen Fleming einmal erwähnt, ohne aber anzugeben, daß sich seine Beschreibungen des Pilzes auf diesen Nährboden beziehen. Eine Temperatur von 20° ist vorteilhaft, 37° ist nicht günstig. In Fleischbrühe bildet der Pilz nach dem gleichen Autor zuerst ein dünnes Myzel, dann setzt starke Faltenbildung ein. Die Fleischbrühe wird gelb verfärbt. Die verbrauchte Nährlösung ist alkalisch, p_H etwa 8,5—9. Die von Fleming gegebene Beschreibung seines Pilzes paßt auf keine der von uns isolierten Arten.

4. Beschreibung der Versuche (Methoden).

Isolierung der Organismen: Diese erfolgt aus dem Erdreich sowie dem Nektar verschiedener Blüten. Die steril entnommenen Erdproben werden in sterilen Glasröhrchen in das Laboratorium gebracht, in Verdünnungen 1:100 mit sterilem destilliertem Wasser aufgeschwemmt und in Petrischalen mit Bierwürze-Agar (4^o Ball.) und in Röhrchen mit Zellulosestreifen, die mit einer anorganischen Nährlösung nach Stapp (siehe unten) angefeuchtet waren, übertragen. Der Nektar wurde auf dem Standort der Pflanzen mit sterilen Kapillaren entnommen und hier direkt auf Bierwürze-Agar in Proberöhrchen überführt. So wurden die Rohkulturen gewonnen.

Reinzüchtung der Organismen: Diese erfolgte vorwiegend auf Asparagin-Agar und Normalboden in Petrischalen.

Erhaltung der Kulturen: Für diese Zwecke eignen sich Karottenstücke, welche man in Proberöhrchen einführt, ausgezeichnet. Die Stämme bleiben mindestens ein halbes Jahr frisch und gesund. Die Kulturen auf Zellulosestreifen ertragen desgleichen ein Eintrocknen und bewahren 10—12 Monate ihre Lebenskraft.

Nährböden zur Bestimmung der Arten (vgl. Tab. I, IIa und IIb):

Czapek-Agar: 0,3% Natriumnitrat, 0,1% saures Kaliumphosphat, 0,05% Magnesiumsulfat, 0,05% Kaliumchlorid, 0,001% Eisensulfat, 3% Rohrzucker, 1,5% Agar-Agar in Leitungswasser.

Normalboden Sopp: Neutrale Fleisch-Peptonlösung, 3% Glycerin, 3% Rohrzucker, 10% Gelatine oder 2% Agar in Leitungswasser.

Asparagin-Agar: 1% Asparagin, 0,5% saures Kaliumphosphat, 0,25% Magnesiumsulfat, 7,5% Saccharose, 2% Agar in Leitungswasser.

Milchnährboden: 20 ccm Magermilch, in 100 ccm fassenden Erlenmeyer-Kölbchen.

Zellulose-Substrat sauer: Dünne Streifen von Sulfat-Zellulose in Proberröhrchen eingeführt, in halber Höhe der Zellulosestreifen versetzt mit der physiologisch sauren Nährlösung nach *Stapp*²⁶: 0,05 % Ammoniumsulfat, 0,025 % saures Kaliumphosphat, 0,01 % Magnesiumsulfat in destilliertem Wasser; p_H mit Schwefelsäure auf etwa 6 eingestellt.

Zellulose-Substrat alkalisch: Anordnung wie vorher, aber mit physiologisch alkalischer Nährlösung: 0,05 % Natriumnitrat, 0,05 % saures Kaliumphosphat, 0,025 % Magnesiumsulfat in destilliertem Wasser.

Brotnährboden: Angefeuchtete Schwarzbrotbrösel in dünner Schicht in 100 ccm fassenden Erlenmeyer-Kölbchen.

Kartoffelscheiben: Sauber gewaschene und geschälte Kartoffel in Scheiben geschnitten und in Petrischalen gelegt.

Woeltje-Asparagin-Lösung: Wie Asparagin-Agar, aber ohne Agar-Zusatz; 20 ccm Lösung in 100 ccm Erlenmeyer-Kölbchen.

Raulin-Gelatine: Diese besteht aus zwei Lösungen. Lösung 1: 0,4 g Magnesiumkarbonat, 0,71 g Weinsäure mit destilliertem Wasser auf 100 ccm auffüllen. Lösung 2: 46,6 g Rohrzucker, 2,66 g Ammonnitrat, 0,4 g Diammonphosphat, 0,16 g Ammonsulfat, 0,04 g Zinksulfat, 0,04 g Eisensulfat mit Leitungswasser auf 800—900 ccm auffüllen. Zu der fertigen Lösung 2 fügt man 66 ccm der Lösung 1 hinzu.

Versuchsdurchführung: erfolgte in einer Gärkammer von 24—26° im Dunkeln.

Zusammenfassung.

Es wird über die Verbreitung und über die Gemeinschaften der Untersektion *Radiata* der Pilzgattung *Penicillium* in der Natur berichtet.

Ihre typischen Merkmale auf genau bekannten, leicht reproduzierbaren Nährböden werden beschrieben und zu einem Bestimmungsschlüssel zusammengefaßt. Es wird versucht, die *Radiata* in Typenreihen zu gliedern.

(Aus dem Botanischen Institut der Universität Münster.)

Über die Ernährungs- und Wachstumsfaktoren der Nitrifikationsbakterien.

Von

H. Bömeke.

(Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 4. Oktober 1946.)

Die vorliegende Abhandlung ist als Einleitung zu einer Reihe von Arbeiten über die *Nitrifikationsbakterien* gedacht. In einer früheren Veröffentlichung (1939) habe ich bereits Angaben über das Vorhandensein eines dissimilatorischen Stoffwechsels dieser Autotrophen gemacht. Bisher wurde nämlich behauptet, daß sie außer der NH_3 - bzw. NO_2 -Oxydation über keinen oxydativen Stoffwechsel verfügen. Darum wurde die Oxydation des Ammoniaks bzw. des Nitrits fälschlicherweise als eine „anorganische Atmung“ hingestellt. In den folgenden Veröffentlichungen wird nachgewiesen werden, daß auch nach beendeter Nitrifikation noch ein oxydativer Vorgang in bzw. an der hungernden Nitrifikantenzelle sich abspielt. Bei den Vorarbeiten mußte eine Anzahl von Versuchen durchgeführt werden, die unsere Vorstellung über die autotrophen Nitrifikationsorganismen abrunden. In der vorliegenden Arbeit sind vor allem die Ernährungs- und Wachstumsverhältnisse zweier *Nitrit*- und eines *Nitratbildner*-Stammes zusammengestellt. Bevor ich die einzelnen Versuchsergebnisse bespreche, bringe ich einen allgemein-methodischen Teil, der in der Folge für alle meine Arbeiten über *Nitrifikationsbakterien* gilt.

Allgemein-methodischer Teil.

Die von mir für gewöhnlich verwendeten Nitrifikationsnährlösungen hatten folgende Zusammensetzung je 1 Liter:

a) *Nitritbildner*: 2,0 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,5 g K_2HPO_4 ; 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 6,0 g CaCO_3 ; $\text{pH} = 7,3-7,4$. — b) *Nitratbildner*: 4,0 g NaNO_2 ; 0,5 g K_2HPO_4 ; 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,0 g CaCO_3 ; $\text{pH} = 7,2-7,3$.

Die obigen Nährlösungen bezeichne ich in der Folge als die üblichen; andere werden eigens angeführt. Die Nährsalze wurden in der Regel — soweit die Versuchsanordnung es zuließ — in Leitungswasser gelöst. Das Leitungswasser enthielt u. a. Sulfate, war arm an Eisen, dagegen reich an Chlor und Calcium und hatte eine schwach alkalische Reaktion ($\text{pH} = \text{ca } 7,2$). Der Trockenrückstand betrug nach einer früheren Bestimmung 585 mg/Liter, der Glührückstand 178 mg/Liter.

Die benutzten Chemikalien waren ausnahmslos pro analysi und die reinsten, die ich von Merck, Schering u. a. erhalten konnte. — Die im Versuch verwendeten Kulturgefäße waren aus Jenaer Glas.

Sterilisiert wurde die anorganische Nährlösung im Autoklaven $\frac{1}{2}$ Stunde bei 1 Atm. Durch die Sterilisation verlor die übliche Nährlösung für den *Nitritbildner* etwa 5% N. Während des 3—4 wöchigen Verweilens der Kulturen im Brutschrank verschwanden je nach der H-Ionenkonzentration weitere 7—13% N, so daß mit rund 12—18% N-Verlust während der Kultur des *Nitritbildners* zu rechnen ist. Der N-Verlust der nitrithaltigen *Nitrobakter-Nährlösung* war $< 1\%$ und kann daher vernachlässigt werden.

Die Beimpfung erfolgte 1—3 Tage nach der Sterilisation der Nährlösung. Nach der Beimpfung standen die Kulturen ca. 3—4 Wochen in elektrisch heizbaren Brutschränken bei einer Temperatur zwischen 35 und 37° C.

Die Prüfung auf Nitrifikation erfolgte zur groben Orientierung qualitativ mittels Tüpfelmethode. Bei der Ammoniak- und Nitratbestimmung war diese Methode insofern von der früher (1939) bereits von mir beschriebenen abgeändert, daß statt der Glasscheibe mit Papierstückchen eine Porzellanplatte mit Mulden genommen wurde, in die je 1 Tropfen Neßlerreagens bzw. Diphenylaminschwefelsäure gegeben wurde. Mit der Impföse brachte ich ein wenig von der zu untersuchenden Flüssigkeit an das Reagens. Zeigte sich an der Berührungsstelle keine Verfärbung bzw. eine Blaufärbung, so galt die Lösung als NH_3 -frei bzw. NO_3 -haltig. Nitrit stellte ich mit dem β -Naphtholreagens nach Riegler¹ fest.

Wenn 3—4 Wochen nach der Beimpfung in der Kulturlösung des *Nitritbildners* kein Nitrit festzustellen war, so wurde keine Nitrifikation verzeichnet. War Nitrit vorhanden, so prüfte ich mit dem Neßlerreagens auf Ammoniak. Zeigte sich die Kultur NH_4 -frei, so galt sie als ausnitrifiziert, im anderen Falle bestimmte ich quantitativ das produzierte Nitrit. Beim *Nitritbildner* prüfte ich die Kulturlösung zunächst ebenfalls mit dem Rieglerreagens auf Nitrit. Wurde sie NO_2 -frei gefunden, galt die Nitrifikation als beendet, sonst bestimmte ich wie beim *Nitritbildner* das noch vorhandene Nitrit quantitativ.

Gelegentlich machte ich auch quantitative Ammoniakbestimmungen nach der Mikrokjeldahl-Methode. Ausführung: 10 cm der $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -haltigen Nährlösung wurden in einen Destillationskolben aus Quarz gefüllt, an die Apparatur angeschlossen und durch Zugabe einiger Tropfen konzentrierter Lauge stärker alkalisch gemacht. Durch strömenden Wasserdampf wurde das Ammoniak aus der Nährlösung ausgetrieben und innerhalb 6 Minuten in $n/10$ HCl destilliert und gegen $n/10$ KOH titriert. Als Indikator diente ein rot-grüner Mischindikator (Methylrot — Methylenblau).

Die quantitative Nitritbestimmung erfolgte kolorimetrisch mit dem Rieglerreagens am Photometer von Zeiß, Jena. Als Farbfilter benutzte ich das Grünfilter „S 53“, welches mit der roten Analysenlösung gute Farbkontraste liefert. Als Küvette hat sich die von 30 mm Länge am besten bewährt. Die Eichkurve wurde nicht von einer reinen NaNO_2 -Lösung in aqua dest. aufgenommen, sondern mit der üblichen NaNO_2 -haltigen Nährlösung für den *Nitratbildner*. Es hatte sich nämlich im Laufe der Vorarbeit herausgestellt, daß sich beide Kurven nicht vollständig deckten. Ich halte es daher für angebracht, an dieser Stelle kurz auf einige diesbezügliche Fehlerquellen bei der Nitritbestimmung hinzuweisen.

Am Stufenphotometer ist bekanntlich nur ein begrenzter Konzentrationsbereich genau ablesbar. Man muß daher vor dem Zusatz der Reagen-

¹ Angaben über die Herstellung dieses Reagens: siehe *Heubült* 1929, S. 403.

tien in der Regel die Kulturflüssigkeit verdünnen. Ferner dürfen keine größeren Mengen Kolloide in der Lösung vorhanden sein, weil sie bei der Bildung des roten Farbstoffes stören. Daher verdünnte ich zunächst in einem 100 ccm-Meßkölbchen die zu bestimmende Kulturflüssigkeit — es waren meistens 1—10 ccm — mit etwa 70—80 ccm Wasser, machte die Lösung mit 0,5 ccm $n/2$ NaOH stärker alkalisch und füllte auf 100 ccm auf. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltriert; von dem klaren Filtrat wurden 10 ccm in einen 1-Liter-Meßkolben pipettiert, der vor Zusatz der Reagentien zu $3/4$ mit Wasser gefüllt wurde. Jetzt erst setzte ich die Reagentien zu: 1 ccm Rieglerreagens, 1 ccm 7,5%ige HCl, 1 ccm 15%ige NH_4OH . Nach jeder Zugabe eines Reagens ist kurzes, kräftiges Umschütteln der Lösung erforderlich. Darauf wird der Meßkolben bis zur Marke gefüllt, und die Nitritbestimmung kann erfolgen.

Nitrate bestimmte ich nicht quantitativ.

Die Wasserstoffionenkonzentration wurde am pH -Apparat der Firma P. Altmann, Berlin, ionometrisch mittels Chinhydron-Elektrode gemessen. Für eine Messung nahm ich möglichst 10 ccm Flüssigkeit. Die Lösung wurde eine Minute mit Chinhydron geschüttelt, der pH -Wert darauf sofort bestimmt. Temperaturkorrekturen wurden nicht vorgenommen, weil die Lösungen bei Zimmertemperatur, meist zwischen 18—20° C gemessen wurden.

Als Teste auf Reinheit der Kulturen verwendete ich folgende Nährlösungen bzw. -böden: a) Hefewasser: 25—30 g frischer *Bäckerhefe* wurden mit 1 Liter Leitungswasser in einem Dampftopf kurz (10 Min.) aufgekocht, die überstehende Flüssigkeit kalt dekantiert und zur weiteren Klärung zentrifugiert. Die so erhaltene wasserklare Lösung wurde in Reagensgläser gefüllt und sterilisiert. Trat nach dem Sterilisieren nochmals eine leichte Trübung auf, so ließ ich diese sich absetzen. Nach einigen Tagen waren die Röhrchen dann völlig klar und für die Beimpfung brauchbar (pH ca. 7,2). — b) Nährbouillon: 10 g Liebig's Fleischextrakt, 10 g Pepton (Witte) und 5 g NaCl wurden mit 1 Liter Leitungswasser aufgekocht, heiß neutralisiert mit n -NaOH (Indikator: Phenolphthalein), abfiltriert und dann in Reagensgläsern sterilisiert. Die Reaktion wechselte zwischen pH 7 und 8. — c) Nähragar: Die obige Nährbouillon mit einem Zusatz von 15 g Agar ergab den Nähragar (pH ca. 7,5). — d) Malzextraktagar: Eine 5%ige, nicht neutralisierte Lösung von Malzextrakt mit einem Zusatz von 1,5% Agar bildete den sauer reagierenden Malzextraktagar (pH ca. 6). — e) Nährgelatine: Die Nährbouillon mit einem 20%igen Gelatinezusatz lieferte die Nährgelatine (pH ca. 7,5—7,8).

Die flüssigen Nährlösungen, Hefewasser und Bouillon, wurden für gewöhnlich benutzt; von Zeit zu Zeit impfte ich auch auf feste Nährböden. — Die Sterilisation der Testlösungen bzw. -böden erfolgte mit Ausnahme der Nährgelatine im Autoklaven während $1/2$ Stunde bei $1/2$ Atm. Die Nährgelatine wurde in strömendem Dampf an 3 aufeinanderfolgenden Tagen je 15 Minuten sterilisiert.

Die Versuche sind mit 4 *Nitrifikanten*-Stämmen — 2 *Nitritbildner*-Stämmen, welche die Nummern 32 und 44 bekommen hatten, und 2 *Nitratbildner*-Stämmen mit der Bezeichnung 14 und M — durchgeführt worden. Von diesen sind die 3 ersten (32, 44, 14) Reinkulturen, während der Stamm M trotz 6-jähriger Kultur von den ihm anhaftenden Begleitorganismen nicht befreit werden konnte. Der letztere wird nur in ganz seltenen Fällen vergleichsweise herangezogen. — Die Stämme 44 und 14 waren seinerzeit in

Berlin von Herrn Prof. Dr. *Engel* und Herrn Dr. *Skallau* mit der von ihnen gemeinsam ausgearbeiteten Verdünnungsmethode (1941) isoliert und mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt worden. Für die Überlassung der Stämme möchte ich an dieser Stelle beiden Herren meinen verbindlichsten Dank aussprechen. Den *Nitrosomonas*-Stamm 32 habe ich selbst vor einigen Jahren nach dem gleichen Verdünnungsverfahren aus einer Komposterde des Botanischen Gartens zu Münster in Reinkultur gebracht. Aus gleichem Boden stammte auch der Nitratbildnerstamm *M.*

Die Angaben über die Salzmenge in den Kopfstücken der Tabellen sind auf 1 Liter berechnet. Als positive Nitrifikation bezeichne ich die Nitritbildung beim *Nitritbildner* und den Nitritschwund beim *Nitratbildner*. In den Tabellen habe ich für positive Reaktion die Zeichen: +, 100% bzw. L (lebend), für negative: —, 0% bzw. T (tot) gewählt. Die Nitritmengen wurden stets auf NaNO_2 umgerechnet.

Versuchsergebnisse.

1. Die Nährsalze (Tab. I).

Zunächst suchte ich nach der günstigsten Nährlösung, die bei optimalem Bakterienwachstum den geringsten Bodensatz besaß und die beste Ausbeute an Bakterienmasse ergab. Hierzu prüfte ich, welche Nährsalze unbedingt erforderlich sind.

Während *Winogradsky* (1906) und in jüngster Zeit auch *Boltjes* (1935) die fördernde Wirkung des Kochsalzes hervorheben, wies *Engel* (1931) nach, daß es ohne merkliche Nachteile für den Nitrifikationsablauf fehlen kann. Die Angaben von *Engel* konnte ich in meiner Untersuchung (1939) bestätigen. Die Notwendigkeit eines Eisenzusatzes zur Nährlösung war ebenfalls umstritten. So behauptete *Winogradsky*, ein Zusatz von 0,4 g FeSO_4 /Liter fördere den Nitrifikationsvorgang wesentlich. *Meyerhof* (1916b) dagegen gab kein zusätzliches Eisensalz zu seinen Nitrifikantenkulturen mit der Bemerkung, Eisen sei selbst in den reinsten Chemikalien immer noch in genügender Menge als Verunreinigung vorhanden, um den normalen Ablauf der Nitrifikation zu gewährleisten.

Um festzustellen, welche Salze schon durch das Leitungswasser allein ersetzt würden, fügte ich 3 Reihen mit Leitungswasser dem Versuch an. Die 200 ccm fassenden Kulturkolben wurden zunächst durch eine 3-wöchige Einwirkung von Chromschwefelsäure gereinigt, darauf mit Leitungswasser gespült und — der Verwendung im Versuch entsprechend — über einen Tag in Leitungs-, einfach bzw. doppelt destilliertes Wasser gelegt, am folgenden Tage nochmals sorgfältig gespült und mit Nährlösung gefüllt. Ihre Beimpfung erfolgte mit einer kleinen Platinöse, die Kultur bei 35° C. Wo die Tüpfelmethode kein eindeutiges Ergebnis gezeigt hatte, wurde die Nitritbestimmung quantitativ am Photometer ausgeführt. Die Werte sind in der Tabelle I niedergelegt.

a) *Nitratbildner*.

Leitungswasser¹: Die 1. Reihe enthielt alle 5 Nährsalze und diente als Kontrolle. Bei günstigem p_{H} -Wert beobachten wir in

¹ Die wichtigsten Bestandteile des Leitungswassers s. S. 63.

sämtlichen Kulturen gutes Wachstum mit ungestört verlaufender Nitrifikation. In der Nährlösung der 2. Reihe fehlten Eisensulfat und Calciumkarbonat. Die NO_2 -Oxydation ging in dieser Reihe ebenfalls ohne merkliche Störungen zu Ende. Das fehlende Eisen und Calcium lieferte anscheinend das Leitungswasser in genügender Menge. Die Nährlösung der 3. Reihe enthielt nur die beiden Salze NaNO_2 und K_2HPO_4 . Diese genügen offenbar nicht zum Aufbau neuer *Nitrobacter*-Zellen. In sämtlichen Kolben blieb die Nitrifikation gänzlich aus. Da in Leitungswasser genügend Schwefel für den Aufbau der Eiweißmoleküle vorhanden gewesen sein dürfte, ist die Ursache für das Ausbleiben der Nitrifikation vermutlich auf Mg-Mangel zurückzuführen.

Einfach destilliertes Wasser. Die 4. Reihe gilt als Kontrolle zu der Gruppe mit destilliertem Wasser. Die Kulturlösung enthält die angegebenen 5 Nährsalze (s. Tab. I). Die Nitrifikation verläuft immerhin noch leidlich, wenn auch die letzten Spuren Nitrit (etwa 1%) nicht in der üblichen Frist von 3—4 Wochen oxydiert wurden.

Die 5. Reihe ($-\text{SO}_4^{--}$) hatte bis auf die Sulfate, die durch die entsprechenden Chloride ersetzt wurden, die gleichen Salze wie die Kulturlösung der 4. Reihe erhalten. Abgesehen von geringfügigen Hemmungen ist das gebotene Nitrit in der gegebenen Zeit oxydiert worden. Hiermit dürfte auch der Beweis erbracht sein, daß in der 3. Reihe nicht aus Sulfat-Mangel die Nitratbildung unterblieben ist. Die leichte Hemmung deutet daraufhin, daß entweder der Schwefel als Minimumfaktor aufgetreten ist oder das Chlor schädlich gewirkt hat.

Die Nährlösung der 6. Reihe ($-\text{CO}_3^{--}$) enthielt mit Ausnahme des Ca-Karbonats, das durch Ca-Sulfat ersetzt wurde, die gleichen Salze wie die Kulturlösung der 4. Reihe. In dieser Kulturlösung trat eine auffallende Verschlechterung der Nitrifikation ein. Kaum die Hälfte des Nitrits ist in dem vorgesehenen Zeitraum verarbeitet worden. Diese Hemmung dürfte auf CO_2 -Mangel zurückzuführen sein, da die H-Ionenkonzentration optimal war und Calcium und die übrigen Elemente zur Genüge vorhanden waren. Das Fehlen des Karbonats wirkt sich demnach weit ungünstiger aus als der Sulfatmangel.

In der 7. Reihe ($-\text{Ca}^{++}$) habe ich die Wirkung des Ca-Mangels auf den Nitrifikationsverlauf des *Nitratbildners* geprüft. Das CaCO_3 wurde in dieser Reihe durch NaHCO_3 ausgetauscht; im übrigen waren die Nährsalze die gleichen wie in der 4. Reihe. Die Kulturlösung enthielt jetzt zwar genügend gelöste Kohlensäure, war aber weitgehend Ca-frei. Nur Spuren von Calcium, die mit der Impfnadel übertragen werden, konnten den *Nitrobacter*-Zellen zur Verfügung stehen. Wenn auch der pH-Wert etwas hoch liegt, so ist er doch keineswegs zu hoch. Trotzdem wird diese Nährlösung schlecht nitrifiziert. Für das Versagen der Nitrifikation kann Ca-Mangel verantwortlich gemacht werden. Offensichtlich benötigen die *Nitrobacter*-Zellen Calcium zu ihrem normalen Gedeihen. Als Puffer zur Herstellung einer neutralen Reaktion ist Ca-Karbonat nicht notwendig, da bekanntlich bei der Nitritoxydation keine merkliche Zunahme der H-Ionen eintritt.

In der 8. Reihe ($-K^+$) wurde das K_2HPO_4 gegen Na_2HPO_4 ausgewechselt. In dieser Reihe nitrifizierten die *Nitratbildner* fast noch besser als in der 4. Alle Kulturkolben waren am Schluß des Versuchs völlig nitritfrei. Daß die *Nitratbakterien* gänzlich ohne Kalium auskommen, ist wohl nicht anzunehmen. Vielleicht ist mit der Impfföse oder durch das $NaNO_2$, welches möglicherweise nicht ganz K-frei war, genügend Kalium in die Lösung gelangt; auch das Jenaerglas kann als K-Spender gedient haben. Um das Kaliumbedürfnis einwandfrei nachzuweisen, bedarf es subtilerer Untersuchungsmethoden (z. B. gereinigtes $NaNO_2$, Quarzkolben, wiederholte Abimpfungen von Kulturen ohne Kaliumzusatz usw.).

Das Phosphorbedürfnis der *Nitrobacter*-Zellen konnte leichter nachgewiesen werden, wie die 9. Reihe ($-PO_4'''$) zeigt. Das K_2HPO_4 war durch K_2SO_4 ersetzt. Kalium- und Sulfationen sind bestimmt nicht schädlich für die *Nitratbildner* und doch beobachten wir in dieser Reihe in keinem der Kulturkolben auch nur die geringste Andeutung einer Nitrifikation. Wir müssen daher annehmen, daß die Nährlösung weitgehend PO_4''' -frei war und daß für den Aufbau der Bakterienzellen größere Mengen P gebraucht werden.

Doppelt destilliertes Wasser. In der 10. Reihe ($-Mg^{++}$) wurde das $MgSO_4$ fortgelassen. Durch das noch vorhandene $FeSO_4$ blieben sicherlich genügend SO_4 -Ionen für den Zellaufbau in der Nährlösung. Das Versuchsergebnis ist auffallend. Auch nicht eine einzige Kultur nitrifizierte. Diese Versuchsreihe unterstreicht die große Bedeutung des Magnesiums für die Ernährung des *Nitratbildners* bzw. den Nitrifikationsablauf (vgl. 3. Reihe). Läßt man dagegen an Stelle des Magnesiumsulfates das Eisensulfat weg, so ist nur eine geringfügige Störung im Nitrifikationsprozeß wahrzunehmen, wie aus der 11. Reihe ($-Fe^{++}$) ersichtlich ist. Das dargebotene Nitrit wird ähnlich wie bei Sulfatmangel noch zum allergrößten Teil oxydiert. Spuren von Eisen genügen offenbar den Bakterien zur Ausführung ihres gesamten Stoffwechsels.

In der 12. Reihe ($-CaCO_3$) versagt die Nitrifikation ebenso vollständig wie bei Mg-Mangel, obwohl der Reaktion der Kulturlösung nach, ($p_H = 7,45$) nitrifiziert werden müßte. Wie die 7. Reihe zeigt, beginnt die NO_2 -Oxydation auch ohne Ca-Zusatz. Die Spuren des Calciums, die mit der Impfföse von der Mutterkultur übertragen wurden, scheinen für den Zellaufbau, zumindest eines Teiles der Bakterien, zu genügen. Wenn also Ca-Mangel die einzige Ursache für die gestörte Nitrifikation gewesen wäre, hätte sie wenigstens beginnen müssen. Eine mit einfach destilliertem Wasser angesetzte Ca-haltige und CO_2 -freie Nährlösung wurde in der üblichen Zeit ebenfalls zur Hälfte nitrifiziert, wie die 6. Reihe zeigte. Die Ursache für völliges Versagen der Nitrifikation in der 12. Reihe kann somit nur in gleichzeitiger Abwesenheit von Calcium und Karbonat in Gegenwart von doppelt destilliertem Wasser zu suchen sein.

b) *Nitritbildner*.

Für die Untersuchung der *Nitritbildner*-Stämme verwendete ich nur doppelt destilliertes Wasser. Vom Ammonsulfat abgesehen, waren die Nährsalze aus denselben Vorratsflaschen wie für die Untersuchung über den *Nitratbildner* genommen. Auch im übrigen wurden die Kulturen in gleicher Weise behandelt.

Nach den Ergebnissen über den *Nitratbildner* schien es mir nicht notwendig, nochmals dieselben umfangreichen Versuche mit dem *Nitritbildner* zu wiederholen. Denn ohne Ammonsalz geht die Nitrifikation nicht, ebenso wenig ohne Phosphat. Wegen der starken Säurebildung während des Nitrifikationsvorganges ist unbedingt ein Karbonatpuffer notwendig. Phosphate puffern zu wenig, wie frühere, hier nicht angeführte Versuche gezeigt haben. Ammonsulfat durch NH_4Cl zu ersetzen, bewirkt schon eine Hemmung, wie an anderer Stelle dieser Arbeit noch berichtet wird. Kalium würde in genügender Menge höchstwahrscheinlich aus dem Glas entnommen. Das Ca-Bedürfnis der *Nitritbildner* ist bekannt. Daher habe ich nur noch Eisen und Magnesium in die Untersuchung einbezogen.

Der Stamm 44 gedeiht ohne zusätzliches Eisen fast ebenso gut wie der *Nitratbildner*. Dagegen ist ein Zusatz von Magnesium unbedingt erforderlich. Bei Zugabe beider Elemente trat nach einem hier nicht angeführten Versuch keine wesentliche Verbesserung in der Ammoniak-oxydation ein. Bald förderte MgSO_4 allein, bald wirkte die Gegenwart beider Salze ($\text{FeSO}_4 + \text{MgSO}_4$) besser. Doch schien auch diese Nährlösung noch nicht optimal zu sein. Erst Leitungswasser statt aqua bidest. bringt, wie wiederholt bestätigt, eine normale Nitrifikation zustande.

Ähnlich verhält sich auch der Stamm 32, jedoch mit dem Unterschied, daß er in doppelt destilliertem Wasser noch stärker unter Mangelerscheinungen leidet. Eisen- und Magnesiummangel bewirken jedes für sich schon vollständige Hemmung der NH_3 -Oxydation. Selbst in Gegenwart sämtlicher 5 Nährsalze kränkeln die Kulturen, wie eine hier nicht angeführte Untersuchung gezeigt hat. Erst Leitungswasser schafft auch für den Stamm 32 optimale Lebensbedingungen.

Aus den obigen Versuchsergebnissen können wir den Schluß ziehen, daß sämtliche 5 Salze, teilweise wohl nur in Spuren, für beide Nitrifikantengruppen unbedingt notwendig sind. Das Ergebnis ist also kurz folgendes: Höchstwahrscheinlich genügen für den normalen Ablauf der Nitrifikation Spuren von Eisen und Kalium. Ersteres wirkt offenbar nur als Katalyt im Enzymsystem. Der Versuch mit Kalium dürfte nicht ganz einwandfrei sein. Sulfationen scheinen ebenfalls nur in äußerst geringen Mengen benötigt zu werden. Eine deutliche Störung macht sich erst beim Fehlen von Ca und Karbonat bemerkbar. Das Calcium scheint nicht nur als Puffer zur Erhaltung der alkalischen Reaktion zu dienen. Es dürfte vielmehr am Aufbau der Zellen beteiligt sein, könnte allerdings auch als Antagonist zum Mg notwendig sein. Die große Bedeutung des Karbonats kann wohl darin gesehen werden, daß es als CO_2 -Quelle dient. Lebensnotwendig sind vor allem das Magne-

sium und das Phosphat. Beide müssen in größeren Mengen vorhanden sein, wenn eine Nitrifikation erfolgen soll. Für die Unentbehrlichkeit des Magnesiums auch im Stoffwechsel nicht grüner Pflanzen dürfte der Beweis bereits erbracht sein. Es soll beim Kohlenhydratabbau als Bestandteil eines Fermentes (*Schumacher* 1944) eine gewisse Rolle spielen. Durch diese Feststellung wäre ein dissimilatorischer Stoffwechsel in den Nitrifikantenzellen auch aus der Unentbehrlichkeit des Magnesiums abzuleiten. Das Phosphat dürfte in erster Linie am Aufbau der Phosphatide und Abbau von Zuckern beteiligt sein. Man könnte allerdings auch dabei an nukleoproteidähnliche Eiweißverbindungen denken, die dann auf das Vorhandensein von Kernäquivalenten im Bakterienkörper hindeuten.

2. Maximale Stickstoffgaben.

Weil ich für meine späteren Untersuchungen stark angereicherte Bakteriensuspensionen benötigte, versuchte ich die maximalen N-Gaben zu ermitteln, die noch bei normalem Wachstum nitrifiziert werden können. Zwar hatte *Meyerhof* (1916/17) dieses Gebiet eingehend bearbeitet, doch handelt es sich nur um kurzfristige Versuche mit angereichertem Bakterienmaterial, m. a. W. um anormale Fälle; außerdem konnten sich meine *Nitrifikationsbakterien* möglicherweise anders verhalten.

a) Nitritbildner (Tab. IIa).

Aus meinem Versuch über die Verwertung des NH_4Cl (s. S. 88) geht klar hervor, daß dieses Salz nicht als gute Energiequelle für den

Tabelle IIa. Nitrifikation bei gestaffelten $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Gaben.

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ g/Lit.	1g CaCO_3 / Liter							ca 20g CaCO_3 / Liter			
	pH-Wert (27 Tage)				NaNO ₂ mg / Lit. (27 Tg.)			16 Tage		55 Tage	
	1	2	Mittelw.	Kontrolle	1	2	Mittelw.	1	2	1	2
2	5,40	5,60	5,50	7,53	288	435	361,5	+	+	+	+
4	5,90	5,62	5,76	7,30	320	400	360,0	+	+	+	+
6	5,78	5,72	5,75	7,18	260	240	259,0	—	—	+	+
8	5,38	5,54	5,46	6,82	165	187	176,0	—	—	+	+
10	5,90	6,06	5,98	6,80	85	212	148,5	—	—	—	—
12	5,92	5,90	5,91	6,84	162	90	126,0	—	—	—	—
14	6,16	6,25	6,20	6,76	31	64	47,5	—	—	—	—
16	6,22	6,04	6,13	6,82	Spur	Spur	Spur	—	—	—	—
18	6,20	6,30	6,25	6,42	0	0	0	—	—	—	—
20	6,30	6,12	6,21	6,38	0	0	0	—	—	—	—

Nitritbildner in Frage kommt. Eine hier nicht angeführte Untersuchung über die Nitrifizierbarkeit des $\text{Mg}(\text{NH}_4)\text{PO}_4$ zeigte, daß dieses Salz im Nitrifikationsprozeß dem Ammonsulfat unterlegen war. Da ferner das Ammonkarbonat infolge seiner labilen Eigenschaft ebenfalls ungeeignet für Nitrifikationsuntersuchungen ist, blieb nur das Ammonsulfat übrig.

Bei dieser Untersuchung tauchten verschiedene Fragen auf: Bis zu welcher $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentration verläuft die Nitrifikation normal, bei welcher geht sie nicht mehr zu Ende und wann wird mit der N-Oxydation überhaupt nicht mehr begonnen? Sterben in diesem Konzentrationsbereich die Bakterien ab, oder geht das Leben wieder weiter, sobald günstige Lebensbedingungen eintreten? Ist das produzierte Nitrit der begrenzende Faktor oder die $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentration und wie weit spielt die c_H hierbei eine Rolle?

Zur Klärung dieses Fragenkomplexes setzte ich folgenden Versuch mit dem *Nitritbildner* an: Erlenmeyerkölbchen wurden mit der üblichen Nährlösung beschickt, die jedoch statt 2 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eine von 2–20 g pro Liter gestaffelte $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Menge besaß und anfangs bei 1 g CaCO_3 , 27 Tage später bei ca. 20 g CaCO_3 /Liter nitrifiziert wurde. Der gesamte Versuch bestand aus 30 Kölbchen, von denen 20 mit dem Stamm 44 beimpft wurden, die übrigen 10 blieben unbeimpft und dienten als Kontrollen. Die Verteilung der Kölbchen war derart, daß jede $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Stufe zwei beimpfte und ein unbeimpftes Kölbchen enthielt. Die p_H -Bestimmung erfolgte 27 Tage später gleichzeitig mit der quantitativen Nitritbestimmung. Darauf erhielten die gleichen Kulturen ihren in Tabelle IIa angegebenen Karbonatzusatz von 20 g, 16 bzw. 55 Tage später (43 bzw. 82 Tage seit Versuchsbeginn) erfolgte mit dem Neßlerreagens eine qualitative Prüfung auf NH_3 -Gehalt der Kulturen. Die mit + bezeichneten waren zur angeführten Zeit NH_3 -frei, die übrigen nicht. Nach einer genügenden Verdünnung der hochkonzentrierten Kulturlösungen nitrifizierten sämtliche Kulturen. Die Nitrifikationshemmung dürfte demnach in erster Linie auf zu hohe $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentration zurückzuführen sein.

Bei nicht ausreichenden CaCO_3 -Mengen beobachten wir bis 4 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /Liter eine normal verlaufende Nitrifikation. Daß nur ein Teil des gebotenen Ammonsulfats oxydiert wird, beruht auf der Abnahme des p_H -Wertes infolge zu geringer CaCO_3 -Menge. Mit steigender $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentration wird von 8 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /Liter an die Reaktion etwas verbessert, doch geschieht das auf Kosten der infolge der hohen $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentration immer ungünstiger werdenden Lebensbedingungen und der kontinuierlich abnehmenden Nitrifikationsgeschwindigkeit. Bei 18 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /Liter kommt die Nitritbildung ganz zum Stillstand. Daß nicht das Nitrit der störende Faktor gewesen ist, beweist, daß bei annähernd gleichen p_H -Werten bei 2 und 4 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ mehr Nitrit gebildet wurde als bei 6 und 8 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /Liter.

Das Ergebnis dieses Versuchs ist folgendes: 1. Bis 4 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /Liter herrscht ein einigermaßen normales Wachstum. 2. Bis 8 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /Liter kann bei genügendem Kalkzusatz dieses Salz noch oxydiert werden. 3. 18 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /Liter machen jede Nitritbildung unmöglich. 4. In einer Nährlösung mit 20 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /Liter sterben

innerhalb von 55 Tagen die *Nitritbildner* nicht ab, sondern sie nitrifizieren die Nährlösung vollständig, sobald das $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in erträglicher Konzentration zur Verfügung steht. 5. Bis 8 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dürfte die Reaktion der hemmende Faktor gewesen sein; in den Konzentrationen > 8 scheint das $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ von ausschlaggebender Bedeutung zu sein. 6. Wie weit das Nitrit einen schädlichen Einfluß auf den Nitrifikationsverlauf gehabt hat, läßt sich nicht mit Sicherheit entnehmen, da die Giftwirkung des Nitrits stark von der Reaktion der Kulturlösung abhängt (siehe *Mevius und Dikussar* 1930).

b) *Nitratbildner* (Tab. II b).

Da nach einem Orientierungsversuch 4 g NaNO_2 /Liter ohne irgendwelche Störungen, dagegen 12 g nicht mehr oxydiert wurden, untersuchte ich das Intervall von 4—12 g NaNO_2 je Liter. Jede Konzentrationsstufe bestand aus 4 Kölbchen, so daß 2 auf jeden Stamm entfielen. Die Kulturen standen in einem Thermostaten bei 30°C und wurden 1 Monat nach der Beimpfung mittels Tüpfelmethode auf Nitritschwund geprüft.

Tabelle IIb. Nitrifikation bei gestaffelten NaNO_2 -Gaben.

NaNO_2 g/Lit.	St <i>M</i>	St <i>M</i>	p_{H} -Wert
4	+	+	
5	+	+	
6	+	+	
7	+	+	
8	—	—	7,82
9	—	—	7,84
10	—	—	7,83
11	—	—	7,82
12	—	—	7,82

Wie aus der Tab. IIb hervorgeht, ist bis 7 g NaNO_2 /Liter keine wesentliche Verzögerung im Nitrifikationsverlauf festzustellen. Wenn sich bei den höheren Konzentrationen die Nitritphase auch etwas länger hinauszog, so ist zu berücksichtigen, daß in diesen Fällen auch mehr Nitrit vorhanden ist, das oxydiert werden muß. Bei 8 g NaNO_2 /Liter tritt jedoch ganz plötzlich eine starke Störung der Nitrifikation ein. Kulturen mit 12 g NaNO_2 /Liter aus dem hier nicht aufgeführten Orientierungsversuch waren selbst nach 4 Monaten noch nicht nitritfrei. Zu diesen Kulturen, auf welche 6 Wochen die nicht mehr oxydierbaren Nitritmengen eingewirkt haben, gab ich soviel aqua dest., daß

eine erträgliche NO_2 -Konzentration entstand. Nach 8—14 Tagen war sämtliches Nitrit aus der Kulturlösung verschwunden. Nach obigem Versuch betrug die maximale NaNO_2 -Konzentration, die ohne wesentliche Hemmung verarbeitet wird, etwa 7 g/Liter. Wie aus einer später zu schildernden Untersuchung mit NaCl -Zusatz hervorgeht, beruht diese Nitrifikationshemmung nicht auf einer osmotischen Wirkung. Es dürfte somit eine spezifische Wirkung des Nitrits vorliegen. Ferner wurde sichergestellt, daß die *Nitratbildner* in nicht mehr nitrifizierbaren NaNO_2 -Konzentrationen nicht sogleich absterben, sondern die Nitritoxydation einstellen.

3. Temperatur (Tab. III).

Ein viel bearbeitetes, aber nicht völlig geklärtes Kapitel ist die Abhängigkeit der Nitrifikation von der Temperatur. *Schloesing* und *Müntz* (1879) konnten bereits zeigen, daß im Boden bei 5°C noch eine langsame Salpeterbildung stattfindet. *Warrington* erhielt noch bei 3°C eine deutliche Umsetzung. *Rubentschik* fand zwischen 0 und 3°C noch Salpeterbildung. *Schönbrunn* (1922), *Gauger* und *Ziegenspeck* (1929) u. a. berichten über Salpetermaxima im Frühjahr. *Engel* (1931) fand bei 18 — 20°C in der Nitrifikationsnährlösung starke Verzögerung der Nitritbildung; das Optimum lag höher. *Cyplenkin* und *Schilin* (1936) fanden in Tundrenböden an einigen kalkhaltigen Stellen Nitrate im Boden. Diese und weitere andere Arbeiten gaben Anlaß zu einer Untersuchung über den Temperatureinfluß auf die Reinkulturen meiner Nitrifikantenstämme in Nährlösungen.

Der Versuch wurde an 3 Temperaturstufen (10 , 20 u. 30°C) mit je 4 Reihen (2 *Nitrit-* und 2 *Nitratbildner*-Stämmen) durchgeführt. Jede Reihe enthielt 5 Kulturen, so daß der gesamte Versuch aus 60 Erlenmeyerkölbchen mit je 25 cm Nährlösung bestand. Die Kulturen der ersten Temperaturstufe standen bei 10°C in einem Kühlschrank, die der zweiten bei ca. 20°C im Arbeitszimmer (dunkel) und die der dritten bei 30°C im Brutschrank. Geprüft wurden die Kulturen qualitativ an den in der Tabelle III angegebenen Daten mit den Reagentien nach *Neßler* und *Riegler*. Da die 5 Kulturen jeder Reihe sich in den einzelnen Kulturstufen völlig gleich verhielten, ist der Einfachheit halber in der Tabelle statt 5 nur jeweils 1 Reaktionszeichen eingetragen worden.

Tabelle III.
Abhängigkeit der Nitrifikation von der Temperatur.

Nach Wochen	10°C				20°C				30°C			
	<i>Nitrosomonas</i>		<i>Nitrobacter</i>		<i>Nitrosomonas</i>		<i>Nitrobacter</i>		<i>Nitrosomonas</i>		<i>Nitrobacter</i>	
	St 32	St 44	St 14	St M	St 32	St 44	St 14	St M	St 32	St 44	St 14	St M
$3\frac{1}{2}$	—	—	—	—	(+)	(+)	+	+	(+)	(+)	+	+
5	—	—	—	—	(+)	(+)	.	.	+	(+)	.	.
$6\frac{1}{2}$	—	—	—	—	(+)	(+)	.	.	.	+	.	.
10	(—)	—	—	—	+	+

+ = Endnitrifikation (+) = Vollnitrifikation (—) = Beginnende Nitrifikation
— = keine Nitrifikation sichtbar. . = nicht mehr vorhandene Kultur.

Die 1. Prüfung nach $3\frac{1}{2}$ Wochen ergab, daß sämtliche Kulturen, die bei 20 und 30° C gestanden hatten, nitrifizierten; ausnitrifiziert waren bei diesen Temperaturen jedoch nur die 20 *Nitrobacter*-Kulturen. Bei der Temperatur von 10° C war in keinem der Kölbchen eine Nitrifikation festzustellen. Die 2. Prüfung nach 5 Wochen brachte nur die Änderung, daß bei 30° C der Stamm 32 alles NH_3 nitrifiziert hatte. Die 3. Prüfung nach $6\frac{1}{2}$ Wochen ließ jetzt auch die Stammkultur 44 in der Temperaturstufe von 30° C als ausnitrifiziert erscheinen. Damit hatten die Kulturen der 30°-Stufe die N-Oxydation beendet. In den übrigen Temperaturstufen war keine wesentliche Änderung eingetreten. Bei der 4. Prüfung nach 10 Wochen hatten auch die beiden *Nitrosomonas*-Stämme der 20°-Stufe zu Ende nitrifiziert. Von den Kühltankschrankkulturen (10° C) hatte der Stamm 32 vielleicht eine Spur Nitrit gebildet. Stamm 44 zeigte keinerlei Andeutung einer beginnenden Nitrifikation. Wie weit die beiden *Nitrobacter*-Stämme das Nitrit in dieser Oxydationsstufe bereits oxydiert hatten, ließ sich mit der Tüpfelmethode nicht feststellen. Zu Ende geführt war jedenfalls während der 10 Wochen die Nitrifikation nicht.

Wenn es auch scheint, als ob bei Stamm 32 das Temperaturminimum ein wenig tiefer liege als beim Stamm 44, so möchte ich dem Befundé nicht allzu großen Wert beilegen. Der Unterschied war zu gering, um daraus einen sicheren Schluß ziehen zu können. Doch nitrifizieren zweifelsohne die beiden *Nitratbildner*-Stämme bei niedrigerer Temperatur als die *Nitritbildner*-Stämme, was durch zahlreiche weitere Beobachtungen erhärtet werden konnte. Die Angaben *Engels*, wonach schon bei 18—20° C die Nitrifikation eine starke Verzögerung erfährt, finden mit diesen Versuchen ebenfalls eine volle Bestätigung.

4. Kolloide (Tab. IV).

Wie ich — in Übereinstimmung mit anderen Autoren, z. B. *Nelson* (1931) — bereits in einer früheren Veröffentlichung (1939) berichtet habe, hemmt Agar merklich den Nitrifikationsprozeß. Damals ließ ich die Frage offen, ob es die Kolloide sind oder die organischen Substanzen des nicht ausgefaulten Agars, welche die Verzögerung hervorrufen. Daher wiederholte ich diesen Versuch mit ausgefaultem Agar und benutzte gleichzeitig die Kieselsäure als ein anorganisches Kolloid, um ganz sicher zu sein, daß eine evtl. vorhandene Hemmung nicht durch organische Substanzen hervorgerufen werden konnte. Der Agar war wiederum als 0,1%ig in der normalen Nitrifikationsnährlösung vorhanden. Die Kieselsäuregallerte war nach den Angaben von *Boltjes* (1935) hergestellt und nach dem Dialysieren soweit verdünnt worden, bis sie annähernd die Konsistenz einer 0,1%igen Agarlösung hatte. Der gesamte Versuch (Tabelle IV) bestand aus 54 Erlenmeyerkolben mit je 50 ccm Nährlösung, so daß auf jeden der 3 verwendeten Bakterienstämme 18 Kulturen kamen; 6 davon erhielten einen Agar-, 6 einen Kieselsäurezusatz und die restlichen 6 waren Kontrollen. Die c_H wurde zu Beginn des Versuchs ermittelt.

a) *Nitritbildner*.

Aus den Versuchsergebnissen erkennen wir einwandfrei die hemmende Wirkung der beiden Kolloide auf den Nitrifikationsvorgang. Bezüglich des

Tabelle IV. Die Nitrifikationshemmung durch Kolloide.

Kolben Nr.	St 32			St 44			St 14		
	Kontr.	Kiesels.	Agar	Kontr.	Kiesels.	Agar	Kontr.	Kiesels.	Agar
1	+	—	—	+	±	+	+	—	—
2	+	—	—	+	±	+	±	±	—
3	—	+	—	+	—	+	+	±	—
4	+	+	—	+	+	±	+	—	—
5	+	+	—	+	+	±	+	—	—
6	+	+	—	+	+	±	+	—	—
p_H	7,66	7,25	7,53	7,66	7,25	7,53	7,84	8,00	7,81

+ = normale Nitrifikation

± = verzögerte Nitrifikation

— = keine Nitrifikation sichtbar.

Agars verhielten sich die beiden Stämme 32 und 44 seltsamerweise sehr verschieden. Während Stamm 32 in Gegenwart von Agar in keinem Fall nitrifizierte, gelang es dem Stamm 44, in jeder Kultur Nitrit zu bilden, wenn auch mit etwas Verzögerung den Kontrollen gegenüber. Die Kulturen mit SiO_2 -Zusatz arbeiteten in beiden Fällen merklich schneller als die mit Agar, blieben aber gegenüber den Kontrollkulturen doch wesentlich zurück.

b) Nitratbildner.

Ähnlich dürfte der Fall auch beim *Nitratbildner* liegen. Die Kontrollen sind auch hier den Kulturen mit Kolloidzusatz überlegen. Ein Unterschied zwischen Agar und Kieselsäure scheint außerdem auch noch vorhanden zu sein, wenn auch dieser aus dem Versuch nicht ganz einwandfrei hervorgeht.

Offensichtlich rührt also die hemmende Wirkung des Agars weniger von der organischen Substanz als vielmehr von der kolloiden Eigenschaft her. Denn aus obigem Versuch geht klar hervor, daß die Kolloide in der von mir angewandten Konzentration in keinem Fall fördernd gewirkt haben. Die Beobachtungen *Rippels* (1936) über den günstigen Einfluß kolloidalen Agars auf heterotrophe Mikroorganismen lassen sich auf die autotrophen *Nitrifikationsbakterien* nicht ausdehnen.

5. Schichttiefe und Nitrifikation (Tab. V).

Bisher war man allgemein der Ansicht, O_2 -Mangel sei die Ursache für die Nitrifikationshemmung bei erhöhter Schichttiefe der Nährlösung. Um diese Frage zu prüfen, setzte ich folgenden Versuch an.

Der gesamte Versuch setzte sich zusammen aus 32 Erlenmeyerkolben von je 300 ccm Fassungsvermögen mit Nährlösung für den *Nitritbildner*. Die Versuchsanordnung ist aus Tabelle V zu ersehen. Für jede Kombination waren somit zwei Kulturen da, die in der Tabelle nur durch ein Zeichen dargestellt wurden, weil sich die Parallelen sämtlich gleichsinnig verhielten.

Jeder Kulturkolben wurde 2 mal, 20 und 52 Tage nach der Beimpfung, mit dem Neblerreagens auf Ammoniakschwund und mit dem Rieglerreagens auf Nitritbildung bzw. -schwund geprüft.

Tabelle V. Einfluß der Schichttiefe und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentration auf die Nitrifikationsgeschwindigkeit.

Stämme	Tage	50 ccm		100 ccm		Zeilen
		0,1 %	0,2 %	0,1 %	0,2 %	
		1. Reihe	2. Reihe	3. Reihe	4. Reihe	
32	20	+	—	—	—	A
	52	.	—	+	—	
32 und 14	20	+	—	(+)	—	B
	52	.	+	+	—	
44	20	(+)	—	—	—	C
	52	+	—	(+)	—	
44 und 14	20	(+)	—	—	—	D
	52	+	—	(+)	—	

+ = NH_3 -frei

(+) = fast NH_3 -frei

— = NH_3 - und NO_2 -haltig

. = nicht mehr vorhandene Kultur.

Am besten läßt sich die 2. mit der 3. Reihe vergleichen, weil sich in diesen Reihen die gleichen absoluten $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Mengen befanden. Sehr klar und überzeugend ist zu sehen, wie bei höherer Schichttiefe und geringerer Konzentration die Nitrifikation besser vonstatten geht als bei niederer Schichttiefe und höherer Konzentration. Beim Vergleich der Zeilen A und B wirkt offenbar die Anwesenheit des *Nitratbildners* nitrifikationsfördernd. Aus der Untersuchung mit dem *Nitritbildner*-Stamm 44 ist dieser Unterschied nicht zu ersehen.

Die Auswertung dieses Versuches lehrt, daß im vorliegenden Fall nicht der infolge erhöhter Schichttiefe eintretende Sauerstoffmangel, sondern die Erniedrigung der $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentration entscheidend für die Nitrifikationsgeschwindigkeit ist. Für den Stamm 32 ist offenbar Beseitigung des während der Nitrifikation gebildeten Nitrits vorteilhaft. Ob das Gleiche auch für den Stamm 44 gilt, geht aus diesem Versuch nicht hervor. Es erscheint der Stamm 32 jedenfalls nitritempfindlicher. Es spielen somit mehrere Faktoren bei der Ammoniakoxydation eine Rolle.

6. Neutralrot.

a) Neutralrot als Indikator.

Der Versuch wurde bei 35° C mit 2 *Nitritbildnern* und 1 *Nitratbildner* in Erlenmeyerkölbchen mit je 30 ccm der üblichen Nährlösung ausgeführt. Die eine Hälfte erhielt je Kölbchen einen Zusatz von 0,05 ccm einer 0,2%igen Neutralrotlösung, die andere ohne Neutralrotzusatz diente als Kontrolle. Geprüft wurden die Kulturen 27 Tage nach der Beimpfung mit dem Neßler- bzw. Rieglerreagens. Auf eine tabellarische Wiedergabe kann ich verzichten, weil sämtliche Kulturen ohne Unterschied den dargebotenen Stickstoff restlos oxydiert hatten.

Infolge der alkalischen Reaktion der Nährlösung war die Kulturlösung mit Neutralrot anfangs orangerot gefärbt. Vom 10. Tage seit der Beimpfung begann sie sich in den Kulturen mit den *Nitritbildnern* mehr und mehr zu röten und steigerte sich schließlich zum blutroten Farbton. Vom 20.—25. Tage an klang die Rotfärbung ab und näherte sich allmählich dem Orangerot. Beim *Nitratbildner* wurde kein Farbumschlag beobachtet, obwohl die Nitrifikation normal verlief, wie das mikroskopische Bild und der festgestellte Nitratschwund gezeigt hatten.

Da der Vitalfarbstoff „Neutralrot“ gleichzeitig als Indikator auf H-Ionenkonzentration anspricht, kann der Farbwechsel in den *Nitrosomonas*-Kulturen nicht anders gedeutet werden, als daß sich während des Nitrifikationsvorganges rascher die H-Ionen bilden, als sie vom Calciumkarbonat neutralisiert werden. Durch Zusatz von Neutralrot sind wir also in der Lage, den Beginn der Nitrifikation am Farbumschlag ohne weiteres makroskopisch zu erkennen.

Wie die mikroskopische Untersuchung während und nach der Nitrifikation ergab, waren keine Nitrifikantenzellen gefärbt. Vom rötlichen Untergrund hoben sich die einzelnen Bakterien infolge eines hellen Hofes deutlich von der Umgebung ab. Der helle Hof dürfte aus einer Schleim- oder Fettschicht bestehen, welche die Zellen rings umgibt und vielleicht auch ein Grund mit dafür ist, daß die Zelle so außerordentlich widerstandsfähig gegen Austrocknung und Hungern ist. Die von mir angewandte Neutralrotkonzentration war offenbar zu schwach, um die Zellen anzufärben. In Nährlösungen mit wesentlich höheren Neutralrotkonzentrationen nitrifizierten die Bakterien nicht mehr. Der Versuch, die Bakterien mit einer unschädlich wirkenden Neutralrotlösung lebend zu färben, ist somit gescheitert.

b) Neutralrot als organische Substanz (Tab. VI).

Da wir im Neutralrot einen Indikator besitzen, der es uns ohne viele Mühe ermöglicht, den Zeitpunkt lebhafter Nitritbildung zu erkennen, versuchte ich bei verschiedener Schichttiefe der Nährlösung die Wirkung des Neutralrots festzustellen; die 300 ccm fassenden Erlenmeyer-Kolben waren mit von 25 bis 150 ccm gestaffelter Nährlösung gefüllt. Die Zahlen in der Tab. VI geben an, an welchem Tage seit der Beimpfung die Kulturen NH_3 - bzw. NO_2 -frei waren.

Nitritbildner.

Die Wirkung des Neutralrots auf die Zellen dieser Bakteriengruppe ist bei geringer Schichttiefe für beide Stämme 32 und 44 während der

Nitrifikation nachteilig. Bei größerer Schichttiefe wirkt sich der Einfluß des Indikators ebenfalls nachteilig auf den Stamm 32 aus, seltsamerweise dagegen günstig auf den Stamm 44.

Tabelle VI. Einfluß des Neutralrots auf den Nitrifikationsverlauf

ccm	St 32		St 44		St 14	
	Kontr.	Neutral-rot	Kontr.	Neutral-rot	Kontr.	Neutral-rot
25	16	25	16	25	16	16
50	25	47	25	34	16	16
75	34	47	34	34	16	16
100	47	78	47	47	16	16
125	53	78	78	53	16	16
150	63	100	78	63	25	25

Ob beim Stamm 44 das Neutralrot stimulierend auf den N-Oxydationsprozeß eingewirkt hat, oder ob die Förderung Zufall war, ist aus diesem Versuch nicht zu entnehmen. Gesichert dürfte jedenfalls die stärkere Hemmung des Stammes 32 durch Neutralrot im Vergleich zu Stamm 44 sein. Nach den Versuchsergebnissen mit höheren Neutralrotkonzentrationen und nach hier nicht angeführten Temperaturversuchen in Gegenwart dieses Indikators zu urteilen, dürfte eher eine Schädigung als Förderung durch Neutralrot vorliegen.

Nitratbildner.

Auffallend ist das von *Nitrobacter* erhaltene Ergebnis. Durch die Schichttiefe sowie durch Neutralrot scheint er sehr wenig beeinflußt zu werden. Erst bei 150 ccm Nährlösung dürfte die NO₂-Oxydation vielleicht etwas verzögert worden sein. Hierbei ist allerdings noch zu berücksichtigen, daß die zu oxydierende Nährlösungsmenge auch größer ist als in den übrigen Kulturen.

Daß beim *Nitratbildner* die Oxydationsverhältnisse anders liegen als beim *Nitritbildner*, wird mit der Kahmhautbildung der ersteren zusammenhängen. Die Kahmhaut schwimmt an der Oberfläche. Ein Sauerstoffmangel dürfte für diese Bakterien nicht in Frage kommen, ebenso wenig eine Reaktionsverschiebung während des Nitrifikationsvorganges. Die Empfindlichkeit gegen organische Substanz (Neutralrot) ist beim *Nitratbildner* geringer als beim *Nitritbildner*.

7. Schwärmstadien.

Da das Neutralrot ohne großen Aufwand an Arbeit und Material es gestattete, den Beginn der Ammoniakoxydation in Nitritbildnerkulturen makroskopisch zu erkennen, prüfte ich beide Stämme in

Gegenwart dieses Indikators bei verschiedener Schichttiefe. Durch O_2 -Mangel, der bei größerer Schichttiefe in der Nährlösung auftritt, versuchte ich die *Nitrosomonas*-Zellen zur Schwärmerbildung zu veranlassen.

Der Versuch bestand aus 24 Erlenmeyerkolben von je 300 ccm Inhalt, die mit gestaffelter Nährlösung wie beim vorigen Versuch beschickt waren. Die eine Hälfte der Kolben hatte die übliche Nährlösung mit der früher angegebenen Neutralrotkonzentration, die andere blieb ohne Indikatorzusatz. Die Beimpfung erfolgte aus gleichaltrigen Stammkulturen; zwölf Kolben — 6 mit, 6 ohne Neutralrotzusatz — wurden mit Stamm 32, die übrigen mit Stamm 44 beimpft.

Am 30. 6. 41, rund 10 Tage nach der Beimpfung, trat in den Kolben mit 25 ccm Nährlösung und Indikatorzusatz die erste Rötung der Kulturflüssigkeit auf, die von diesem Zeitpunkt an ständig zunahm und bald auch auf die Kulturen mit größerer Schichttiefe übergriff, und zwar wiederum ungefähr in der Reihenfolge der Nährlösungsmengen. Als am 3. 7. sich auch die Kulturen mit 150 ccm Nährlösung zu röten begannen, nahm ich sie aus dem Brutschrank und stellte sie auf schwarzes Papier im Arbeitszimmer, um das Auftreten der Schwärmer sicherer erkennen zu können; die Kulturen mit Neutralrot standen bei etwas höherer Temperatur auf dem Brutschrank.

Am 7. 7. setzte plötzlich in den Kulturen mit 125 und 150 ccm Nährlösung ohne Neutralrot eine mehr oder minder starke milchige Trübung der bis dahin wasserklaren Flüssigkeitsschicht über dem Bodensatz der Kulturlösung ein. Die mikroskopische Untersuchung ergab in der Tat schwärmende Bakterien. Untersucht wurde im hängenden Tropfen bei 1350facher Vergrößerung. Die Bewegungsgeschwindigkeit vom Fleck war gering, so daß ich das zitternde Gewimmel unter dem Mikroskop zunächst für Brownsche Molekularbewegung hielt. Bei genauerem Zusehen erkannte ich jedoch, daß eine gewisse Zielstrebigkeit doch in dem anscheinend ungeordneten Hinundher vorhanden war. Hatten sich nämlich zwei Individuen mit ihren Geißeln verwickelt, so versuchten sie wieder auseinander zu kommen. Mit der Zeit verlangsamte sich die tänzelnde Bewegung immer mehr und hörte zuletzt ganz auf. Die Bewegung der Bakterien war zitternd und gaukelnd, so wie seinerzeit *Winogradsky* (1906) und später (1931) *Engel* sie beschrieben haben. Nur die kugelrunden und die Diplokokken schienen Geißeln zu besitzen, denn nur diese bewegten sich: die ellipsoidischen Formen dagegen waren unbeweglich. Während die Einzelkokken einigermaßen auf ein Ziel (Rand des Tropfens) zustrebten, ist die Bewegungsrichtung der Diplokokken ungerichtet. Es sah so aus, als ob die Diplokokken kurz vor der Teilung stünden und jeder Kokkus bereits ein selbständiges Individuum sei, das nun danach trachte, sich von seinem Partner zu lösen. Darauf ist es vielleicht zurückzuführen, daß gerade die Diplokokken sich nur wenig von der Stelle bewegten, sich oft um ihre eigene Achse drehten und zitternd bald vorwärts, bald rückwärts schwammen.

Daß diese beweglichen Bakterien Verunreinigungen der *Nitrosomonas*-Kulturen gewesen seien, erscheint ausgeschlossen, da ich von diesen Kolben an verschiedenen Tagen mehrfach Abimpfungen in Hefewasser und Bouillon

vornahm. In keinem Fall ist selbst nach Wochen auch nur die geringste Trübung aufgetreten. Die Reinheit der Kulturen steht außer jedem Zweifel.

Ob das Auftreten von Schwärmstadien auf Oz-Mangel zurückzuführen ist, bedarf noch weiterer Nachprüfungen. Aus Zeitmangel bin ich leider nicht mehr dazu gekommen, systematisch, unter Berücksichtigung anderer Faktoren, z. B. des Wetters, der Jahreszeit, der Temperatur usw., die Bedingungen für das Auftreten der Schwärmstadien zu untersuchen.

8. Indigocarmin (Tab. VII).

Um auch für den *Nitratbildner* einen brauchbaren Indikator für den Beginn des Nitrifikationsprozesses zu finden, untersuchte ich in Gegenwart von Indigocarmin die nitrifizierenden Kulturen. Die Fragestellung dieses Versuchs war: Es könnte vielleicht während der N-Oxydation durch Reduktion des Indigos dessen Leukobase entstehen und damit der Zeitpunkt des Nitrifikationsbeginns makroskopisch am Farbumschlag erkannt werden.

Um gleichzeitig auch das Verhalten des *Nitritbildners* in diesem Zusammenhang zu prüfen, setzte ich 15 Kulturen, 5 je Stamm, an. Als Kontrollen fügte ich noch 4 unbeimpfte Kölbchen hinzu, und zwar 2 mit der Nährlösung für den *Nitrit-* und 2 mit der für den *Nitratbildner*, so daß der ganze Versuch 19 Kölbchen umfaßte. (Tab. VII.) Die Nährlösungen waren die üblichen für *Nitrosomonas* bzw. *Nitrobacter*, auch die Kontrollen hatten einen Indigocarminzusatz von 0,01 % und standen bei 35° C im Thermostaten.

Tabelle VII. Versuchsergebnis mit Indigocarmin

Kolben Nr.	Farbe der Kulturen nach 2 Monaten		
	St 32	St 44	St 14
1	rot	rot	blau
2	rot	rot	blau
3	rot	rot	blau
4	rot	rot	blau
5	rot	rot	blau
Kontrollen			
	<i>Nitros.-Nährl.</i>	<i>Nitrob.-Nährl.</i>	
	dunkel- blau	hell- blau	
	dunkel- blau	hell- blau	

Zehn Tage nach der Beimpfung begann in den beimpften *Nitrosomonas*-Kulturen der blaue Farbstoff zu verblassen, und 3 Wochen später war er völlig verschwunden. An seine Stelle war eine rosarote Färbung getreten. Die unbeimpften Kontrollen hierzu waren noch ebenso dunkel wie zu Beginn des Versuchs. Intensiv blau gefärbt waren und blieben die beimpften und ausnitrifizierten *Nitrobacter*-Kulturen,

deren unbeimpfte Kontrollen dagegen im Laufe der Zeit nach und nach etwas heller wurden, jedoch weiterhin blau gefärbt blieben.

Wie lassen sich diese merkwürdigen Erscheinungen erklären? Eine Reduktion des Indigos während der N-Oxydation durch *Nitrosomonas* konnte schwerlich vorliegen, weil dann diese Erscheinung auch beim *Nitratbildner* hätte auftreten müssen. Eine Zerstörung des Indigos durch Nitrit anzunehmen schien ebenfalls abwegig, weil die Lösung für die *Nitrobacter*-Kulturen mit rund der doppelten Nitritmenge (4 g NaNO_2 /Liter) sich bedeutend langsamer entfärbte. Weitere hier nicht angeführte Versuche ergaben schließlich, daß die während der Nitrifikation entstehende salpetrige Säure die Ursache des Indigoschwundes gewesen war. Beimpft man nämlich die indigocarminhaltige *Nitrosomonas*-Nährlösung gleichzeitig mit dem *Nitratbildner*, so tritt keine Entfärbung (Zerstörung!) des Indigos auf. Damit ist auch eindeutig bewiesen, daß eine Heterotrophie auf Indigo nicht vorliegt. Das Verschwinden des blauen Indigofarbstoffes war auf die Anwesenheit von H-Ionen in nitrithaltiger Lösung zurückzuführen. Denn nicht Nitrite, sondern die während der Ammoniakoxydation auftretende salpetrige Säure bewirkte erst die Entfärbung des Indigos. Damit ist weiterhin sichergestellt, daß während des Nitrifikationsverlaufs keine salpetrige Säure in nennenswerten Mengen auftritt, wenn beide Nitrifikanten gleichzeitig in der Lösung vorhanden sind.

Dieser Versuch beweist also schlagend, daß die frühere Ansicht verschiedener Autoren: es müsse zuerst der *Nitritbildner* das gesamte Ammonsalz oder zumindest den allergrößten Teil nitrifiziert haben, bevor der *Nitratbildner* die Nitrite weiter oxydieren könne, wenigstens in einer Nährlösung mit CaCO_3 als Bodenkörper, nicht zutrifft. Wenn der p_{H} -Wert tief genug ist und größere Mengen freien Ammoniaks fehlen, nitrifiziert der *Nitratbildner* trotz Vorhandenseins von Ammonsalzen. Meine bereits in der früheren Arbeit (1939) ausgesprochene Ansicht findet mit diesem Versuch eine Bestätigung.

9. Die Bedeutung des Calciumkarbonats bei der Nitritbildung.

Da in meiner früheren Untersuchung über nitrifizierende Bakterien mit gestaffelten CaCO_3 -Mengen das gebildete Nitrit nicht quantitativ ermittelt worden war, habe ich nochmals einen ähnlichen Versuch angestellt, der neben den p_{H} -Werten auch das Nitrit quantitativ erfaßte. Weil die Versuchsanordnung von der der früheren abwich, sei sie hier kurz dargelegt.

Die mit aqua dest. angesetzte Nährlösung war die übliche, jedoch mit dem Unterschied, daß statt 6 g CaCO_3 eine von 0–6 g in 10 Stufen gestaffelte CaCO_3 -Menge gegeben wurde; außerdem erhielten sämtliche Kulturen 2 g NaCl /Liter. Dazu kamen noch 3 Kulturen mit der üblichen Nährlösung in Leitungswasser. Als Kulturgefäße nahm ich 200 cem fassende Erlenmeyerkolben mit 30 cem Nährlösung. Jede Karbonatstufe bestand aus 3 Parallelen, 2 davon wurden beimpft, die 3. blieb unbeimpft und diente als Kontrolle zu den p_{H} - und Nitritwerten. Kultiviert wurden die von einem Stammkolben abgeimpften Nitritbildner 5 Wochen lang bei 35° C. Die

pH- und Nitritwerte sind am Schluß des Versuchs bestimmt und in Tab. VIII niedergelegt.

Tabelle VIII. Abhängigkeit der Nitrifikation und Reaktion von der CaCO₃-Menge

it.	oxydierter N in o/o					P _H -Werte					Bemerkungen
	1	2	Mittelw.	Zu- wachs	Ver- viel- fachg.	1	2	Mittel- wert	Kon- trolle	Diffe- renz	
	~0	~0	0			5,35	5,58	5,46	5,79	0,33	} maximale P _H -Wertsenk- g. ← Wachstumssprung
	1,71	1,43	1,57			5,78	5,74	5,76	6,13	0,37	
	5,10	6,47	5,78	4,21	3,68	5,95	5,90	5,92	6,20	0,28	
	9,35	10,10	9,72	3,94	1,68	6,01	6,00	6,00	6,36	0,36	
	16,70	16,25	16,47	6,75	1,69	5,76	5,81	5,78	6,98	1,20	
	31,10	30,90	31,00	74,52	1,88	6,32	6,33	6,32	7,29	0,97	} geringste N-Verluste
	83,20	82,30	82,75	51,75	2,67	7,24	7,20	7,22	7,37	0,15	
	~100	95,50	97,75	15,00	1,18	7,29	7,23	7,26	7,43	0,17	
	95,50	86,20	90,85	-6,90		7,18	7,16	7,17	7,37	0,20	
	83,20	86,20	84,70	-6,15		7,30	7,31	7,30	7,42	0,12	
	86,20	89,00	87,60			7,20	7,10	7,17	7,38	0,23	

In der CaCO₃-freien Stufe war die gebildete Nitritmenge so gering, daß sie mit dem Photometer nicht erfaßt werden konnte; nur aus dem gesunkenen p_H-Wert in der weitgehend ungepufferten Nährlösung kann auf einen Nitrifikationsbeginn geschlossen werden. Der geringfügige Zusatz von 1/3 g CaCO₃/Liter bewirkt bereits eine deutliche Nitritbildung. Eine weitere Verdoppelung der Karbonatmenge hat eine beträchtliche Steigerung der NO₂-Menge zur Folge. Bei 1 und 2 g CaCO₃ sind die p_H-Werte am stärksten gesunken (vgl. die Kulturen mit den Kontrollen). Zwischen 2 und 3 g CaCO₃ ist der stärkste Zuwachs zu verzeichnen. Bei 4 und 5 g CaCO₃ haben wir die geringsten N-Verluste. In destilliertem Wasser (6 g CaCO₃) verläuft die Ammoniakoxydation verlustreicher als in Leitungswasser. Am Analysentag war zwischen 0 und 2 g CaCO₃/Liter in den Kulturen noch Ammoniak nachweisbar, zwischen 3 und 6 g CaCO₃/Liter dagegen nicht. Zwischen 2 und 3 g CaCO₃/Liter vollzog sich der Übergang zum Neutralpunkt, d.h. von 3 g CaCO₃ ab blieb die Kulturlösung oberhalb, von 0—2 g CaCO₃/Liter unterhalb des Neutralpunktes. Im sauren Bereich blieb also ein Rest an Ammoniak zurück, im alkalischen wurde sämtliches Ammoniak oxydiert. Nur in einem Falle (4 g CaCO₃) wurde in den NH₃-freien Kulturen der theoretische Nitritwert (2090 mg NaNO₂) gefunden. In den übrigen Fällen traten bis zu 17% N-Verluste auf.

Die N-Verluste dürften sich zusammensetzen aus den NH_3 -Verlusten bei alkalischer Reaktion und dem NH_4NO_2 -Zerfall, der bei gleichzeitiger Anwesenheit von Ammoniak und Nitrit in der Kulturlösung erfolgt. Zwischen 0 und 2 g CaCO_3 /Liter ist die Nitrifikation wegen der höheren H-Ionenkonzentration nicht zu Ende geführt worden. Bei 3 g CaCO_3 /Liter verlief wegen der geringen CaCO_3 -Menge die Neutralisation der bei der NH_3 -Oxydation auftretenden H-Ionen zu langsam. Es stand das Nitrit zu lange unter der Einwirkung des Ammoniaks. Dadurch verschwand durch NH_4NO_2 -Zerfall eine beträchtliche Menge Stickstoff aus der Nährlösung. Bei 4 g CaCO_3 /Liter war angenähert der Idealfall erreicht. Die Kultur nitrifizierte schnell und wegen der eben genügenden Karbonatmenge ist es nur zu unerheblichen N-Verlusten gekommen. Bei 5 g CaCO_3 /Liter steigt der N-Verlust wieder an und erhöht sich noch bei 6 g CaCO_3 /Liter. In diesen beiden letzten Fällen wird der N-Verlust infolge erhöhten p_{H} -Wertes vorwiegend auch auf NH_3 -Verluste zurückzuführen sein.

Ein zweiter hier nicht näher angeführter Versuch ohne NaCl-Zusatz verlief ähnlich, jedoch mit dem Unterschied, daß besonders bis zu 3 g CaCO_3 /Liter die Werte der Parallelkulturen untereinander beträchtliche Schwankungen aufwiesen. Dieser Versuch bestätigte meine früheren Ergebnisse (Arch. f. Mikrobiol. 1939, Tab. XIX), daß bei unzureichenden CaCO_3 -Mengen die Nitrifikation in Gegenwart von 2 g NaCl wesentlich gleichmäßiger verläuft als ohne diesen Zusatz. Zwischen 2 und 3 g CaCO_3 zeigte auch dieser Versuch trotz seiner sonstigen Unregelmäßigkeiten den oben erwähnten Sprung bei der Nitritbildung. Der p_{H} -Wert blieb von 3 g CaCO_3 /Liter an ebenfalls schwach alkalisch.

Das Wesentlichste aus diesen Versuchsergebnissen ist: daß 1. auch ohne zusätzliches CaCO_3 die Nitrifikation beginnt, 2. von ≥ 3 g CaCO_3 /Liter die Nitrifikation restlos zu Ende geht, 3. bei 4 g CaCO_3 /Liter die geringsten N-Verluste auftreten, 4. bei schlechter Nitrifikation und hohen p_{H} -Werten die größten N-Verluste auftreten (bis zu etwa 20%) und 5. ein Zusatz von 2 g NaCl/Liter zu den übrigen Nährsalzen bei unzureichenden CaCO_3 -Mengen einen regelmäßigeren Nitrifikationsverlauf bewirkt. Es wird vermutet, daß im CO_2 -Mangel die Ursache für den unregelmäßigen Nitrifikationsbeginn zu suchen ist.

10. Die H-Ionenkonzentration und das Wachstum.

Als Ergänzung meiner Arbeit über *Nitrifikationsbakterien* (1939), in der ich u. a. den „Lebenslauf“ einer *Nitrobacter*-Kultur schilderte, bringe ich hier p_{H} -Wert- und Wachstumskurven meiner beiden *Nitritbildner*-Stämme 32 und 44. Während die Werte über den *Nitratbildner* seinerzeit mit der Warburgapparatur erhalten wurden, war dies infolge des teilweise anders gearteten Stoffwechsels des *Nitritbildners* nicht möglich. Denn diese Bakterien erhöhen bekanntlich während der Nitrifikation die c_{H} und treiben aus den Karbonaten der Nährlösung gasförmiges CO_2 aus. Dadurch wird aber eine manometrische Messung unmöglich gemacht. Daher wählte ich für die vorliegende Untersuchung im Prinzip die gleiche Methode, die Engel (1930) angewandt hat, und bestimmte neben Nitrit außerdem noch die H-Ionenkonzentration.

Zur Ausführung des Versuchs nahm ich 10 große Erlenmeyerkolben von je 3 Liter Fassungsvermögen, die zur Beimpfung und Entnahme der Kulturflüssigkeit seitlich einen Tubus besaßen (s. Abb. 1). Verschllossen wurde jeder Kolben mit einem Wattebausch, über den als Verdunstungs- und Infektionsschutz Stanniolpapier gelegt worden war. Die Nährlösung für sämtliche Kolben wurde gleichzeitig in einer 5 Liter-Flasche hergestellt, damit Zusammensetzung und Reaktion in jeder Hinsicht gleich war. Durch kräftiges Umschütteln der Nährlösung vor dem Abfüllen in die Kulturgefäße wurde weitgehend für eine gleichmäßige Verteilung der unlöslichen Bestandteile gesorgt. Fünf Kolben wurden beschickt mit je 300 ccm, die übrigen mit je 500 ccm der üblichen Nährlösung für den *Nitritbildner*. Drei Tage nach dem Sterilisieren wurden 4 Kolben (2 mit 300 ccm und 2 mit 500 ccm Nährlösung) mit dem Stamm 32, weitere 4 in der gleichen Weise mit Stamm 44 beimpft, die übrigen 2 dienten als Kontrollen. Darauf wurden sämtliche Kolben in ein und denselben Brutschrank von 35° C gestellt. Die beiden 500 ccm-Kulturen des Stammes 32 fielen leider während des Versuches aus.

Die p_H -Wertbestimmungen erfolgten gleichzeitig mit den quantitativen Nitritbestimmungen. Für jede Untersuchung wurden jeder Kultur 10 ccm Lösung entnommen: 5 für die p_H - und 5 für die Nitritbestimmung. Die Kontrollen lieferten die Vergleichslösungen. Die 1. Messung wurde am 4. Tage nach der Beimpfung, die 2. am 7. Tage usw. vorgenommen, wie die Kurven angeben, und zwar morgens zu annähernd gleichen Zeiten, damit die Tagesintervalle als gleich anzusehen sind.

Die Abb. 2a zeigt neben den p_H -Wert-Kurven zwei Kurvenpaare über den Wachstumsverlauf des *Nitrosomonas*-Stammes 44. Die Werte zu den beiden steilen (ausgezogenen) Kurven lieferten die 300 ccm-Kulturen, die zu den beiden stärker geneigten (gestrichelten) die 500 ccm-Kulturen. Zu den 300 ccm-Kulturen gehören die höheren p_H -Werte und die längere Inkubation, die niederen p_H -Werte und die kürzere Inkubation zu den 500 ccm-Kulturen. Trotz längerer Inkubation waren die 300 ccm-Kulturen zwei Wochen früher ausnitrifiziert als die 500 ccm-Kulturen. Am Schluß (43 Tage nach der Beimpfung) wurde in sämtlichen 4 Fällen annähernd der theoretische Nitritwert gefunden.

Auch in der Abb. 2b erkennt man 2 Wachstumskurvenpaare. Das des Stammes 32 ist stärker geneigt und erreicht in keinem Falle den theoretischen NO_2 -Wert. Das Kurvenpaar des Stammes 44 steigt steiler an und nähert sich den theoretischen Werten.

Während der Nitrifikation sinken in allen Kulturen die p_H -Werte, in den seichteren Kulturlösungen schwächer, in den tieferen stärker. Bei den 300 ccm-Kulturen bewegt sich der p_H -Wert — von der ersten Messung abgesehen — zwischen 6 und 7, bei den 500 ccm-Kulturen zwischen 5 und 6. Nach beendeter Nitrifikation steigt der p_H -Wert



Abb. 1. Anzuchtkolben.
W Watte, St Stanniolpapier,
N Nährlösung.

langsam um einige Zehntel an, erreicht aber nicht mehr die neutrale Reaktion.

Aus obigem Ergebnis erkennen wir eine Wechselwirkung zwischen Reaktion und Wachstum. Je höher der p_H -Wert, umso länger dauert die Inkubation, und umso steiler ist hernach die Wachstumskurve. Aber

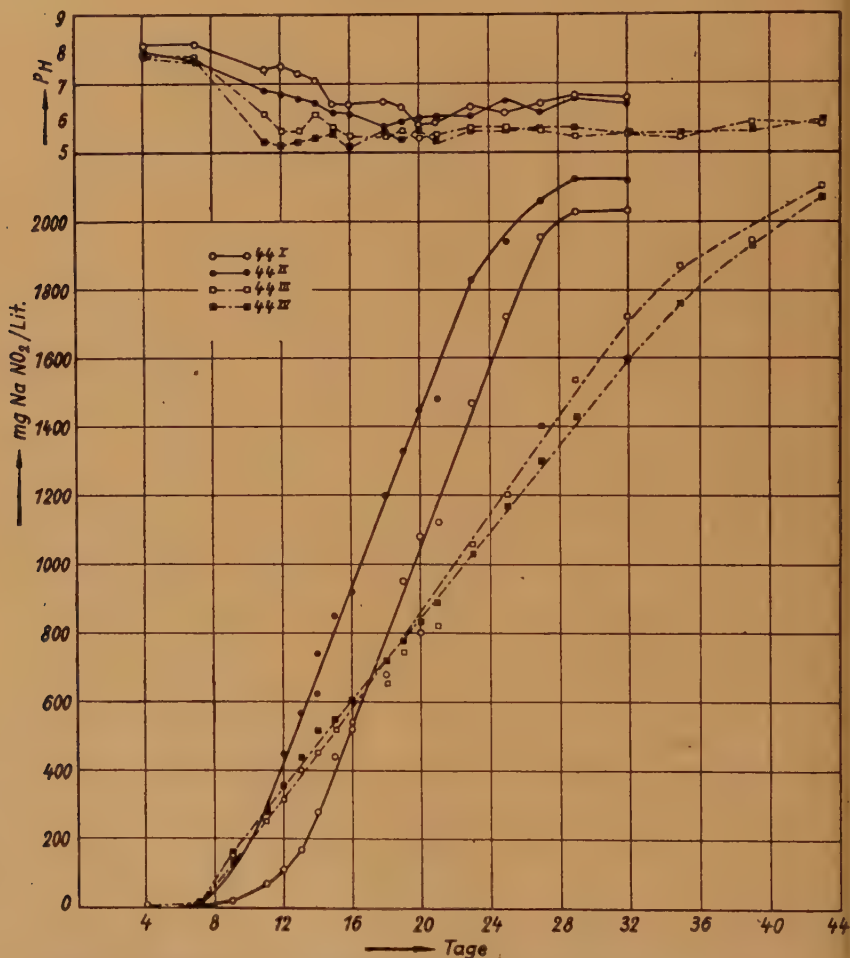


Abb. 2a. Wachstums- und p_H -Wertkurven des Nitritbildnerstammes 44 bei verschiedener Schichttiefe der Kulturlösung.

auch die Schichttiefe scheint die Reaktion und damit auch indirekt das Wachstum zu beeinflussen. Die Kulturflüssigkeit bei größerer Schichttiefe (500 ccm-Kultur) reagiert saurer als bei geringerer (300 ccm-Kultur). Die Wachstumskurven sind entsprechend den p_H -Werten geneigt.

Ähnlich wie bei Stamm 44 liegen auch die Verhältnisse bei Stamm 32, jedoch mit dem Unterschied, daß hier die Kurven stärker geneigt sind, d. h. in anderen Worten, daß der Stamm 32 weniger optimale Bedingungen in der gleichen Nährlösung vorfand als Stamm 44.

In der sog. log. Phase, wo Verdoppelung der Nitritmenge ohne großen Fehler mit Verdoppelung der Bakterienmenge gleichzusetzen

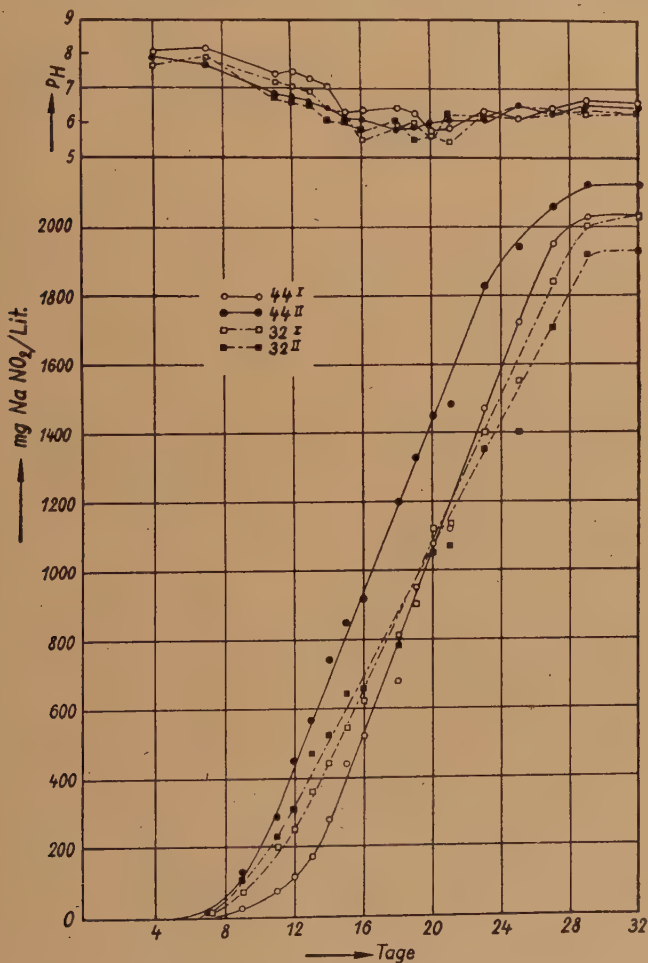


Abb. 2b. Wachstums- und pH-Wert-Kurven der Nitritbildnerstämme 32 und 44 bei gleicher Schichttiefe der Kulturlösung.

ist, fand zwischen dem 4. und 9. Tage seit der Beimpfung — von Kultur 44I abgesehen — etwa alle 15½ Stunden eine Zellteilung statt. Das ist eine für Bakterien ungewöhnlich langsame Teilung, wo sonst stündlich oder ½-stündlich eine Zellteilung erfolgt, ja in extremen Fällen sogar „in Abständen von wenigen Minuten“ (Geitler, 1934, S. 55). Zu ähn-

lichen Werten wie ich sind seinerzeit auch *Engel* (1930) (17 Stunden) und *Meyerhof* (1917) (19 Stunden) gekommen. Die Einzelwerte meiner Kulturen sind:

Stamm 32: 15,7; 15,6; —; — Stunden;

Stamm 44: 20,1; 15,5; 15,4; 14,7 Stunden.

Zusammenfassend können wir sagen: 1. Ein relativ niedriger p_H -Wert zu Anfang verkürzt zwar die Inkubationszeit, verlängert aber später die Nitrifikationsphase. 2. Die Neutralisation der H-Ionen in Gegenwart von Calciumkarbonat bleibt merklich hinter der Säurebildung zurück. 3. Mit Erhöhung der Flüssigkeitsschicht tritt eine Verlangsamung der NH_3 -Oxydation ein. 4. Der *Nitritbildner*-Stamm 32 scheint säureempfindlicher zu sein als der Stamm 44. 5. Alle 15½ Stunden tritt eine Zellteilung beim *Nitritbildner* ein.

11. Die unterschiedliche Nitrifikation des NH_4Cl und $(NH_4)_2SO_4$ bei Zusatz von $NaCl$ bzw. Zusatz von Na_2SO_4 (Tab. IX).

Schloesing machte bereits 1889 die Beobachtung, daß Ammonchlorid wesentlich schlechter nitrifiziert wurde, als Ammonsulfat. Zehn Jahre später fand *Omelianski* (1899), daß ein Zusatz 0,2% $NaCl$ zu der üblichen $(NH_4)_2SO_4$ -haltigen Nährlösung die Nitrifikation günstig beeinflusse. Auch *Boltjes* (1935) und *Hes* (1937) geben eine günstige Wirkung des Kochsalzes an. In meiner Veröffentlichung (1939) konnte ich nicht abstreiten, daß bei unzureichenden $CaCO_3$ -Gaben ein $NaCl$ -Zusatz die Nitrifikation fördert. Doch führte ich die Förderung auf eine Umsetzung von $NaCl$ mit $CaCO_3$ zurück, indem leichter lösliche Salze (Na_2CO_3 und $CaCl_2$) entstehen, wodurch eine CO_2 -Bildung begünstigt wird.

Zur Klärung der Frage: Wie wird die NH_3 -Oxydation durch Zusatz von $NaCl$ und Na_2SO_4 zu einer NH_4Cl -haltigen Nährlösung beeinflusst, setzte ich folgenden Versuch an. Die Nährlösung bestand aus: 0,1 g NH_4Cl ; 0,01 g K_2HPO_4 ; 0,01 g $MgSO_4$; 0,01 g $CaCO_3$; 1,0 g $NaHCO_3$; x g $NaCl$ bzw. x g Na_2SO_4 /Liter aqua dest. Die p_H -Werte wurden am Schluß des Versuchs

Tabelle IX: Nitrifikationshemmung durch $NaCl$

Nr.	Stamm 44						Stamm 32					
	1		2		3		4		5		6	
	$NaCl$ 0,1 %		$NaCl$ 0,5 %		Na_2SO_4 0,5 %		$NaCl$ 0,1 %		$NaCl$ 1,0 %		Na_2SO_4 1,0 %	
	NO_2	p_H	NO_2	p_H	NO_2	p_H	NO_2	p_H	NO_2	p_H	NO_2	p_H
1	+	7,92	—	8,50	++	8,22	+	8,22	—	8,40	++	8,16
2	+	8,16	—	8,46	++	8,20	+	8,26	+	8,28	++	8,17
3	—	8,42	—	8,52	++	8,20	+	8,54	—	8,48	++	8,14
4	++	8,14	—	8,52	++	8,26	—	8,24	—	8,38	++	8,30
5	++	8,07	—	8,52	++	8,04	+	8,16	+	8,38	++	8,14
Kontr.	—	8,48	—	8,52	—	8,54	—	8,48	—	8,50	—	8,52

gemessen, die Nitritwerte nach der Tüpfelmethode ermittelt, wobei je nach der Intensität der Farbreaktion die Zeichen —, +, ++ verwendet wurden.

Obwohl bei sämtlichen Salzkonzentrationen wegen der c_H eine Nitrifikation gut möglich war, sehen wir doch deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (Tab. IX). Die Kulturen der Reihen 1 und 4 arbeiten nur mittelmäßig. Mit Erhöhung der NaCl-Konzentration (Reihe 2 und 5) tritt eine wesentliche Verschlechterung der Nitrifikationsleistung der Bakterien ein. Es scheint jedoch dem Stamm 44 eine 0,5%ige NaCl-haltige Nährlösung weniger gut zu bekommen als dem Stamm 32 eine 1,0%ige. Gibt man dagegen anstatt NaCl die gleichen Mengen Na_2SO_4 , so wird die Störung im Nitrifikationsstoffwechsel plötzlich beseitigt; m. a. W. in Gegenwart von 5 bzw. 10 g Na_2SO_4 wird wesentlich besser nitrifiziert als bei gleichem bzw. geringerem Zusatz von NaCl.

Da beide Salze gleiche Kationen und eine neutrale Reaktion besitzen, kann der nitrifikationsbegünstigende Faktor nur in den Anionen zu suchen sein. Wie aus der Untersuchung über die einzelnen Nahrungssalze hervorgeht, benötigen die *Nitrifikanten* zur Durchführung ihres Nitrifikationsstoffwechsels nur Spuren von SO_4 -Ionen. Diese Mengen sind mit 10 mg $MgSO_4$ bei 100 mg NH_4Cl reichlich bemessen. Es liegt somit eine spezifische Anionenwirkung vor. Das Versuchsergebnis spricht vermutlich gegen eine fördernde Wirkung von seiten des NaCl. Die Angaben *Schloesings*, wonach $(NH_4)_2SO_4$ besser oxydiert wird als NH_4Cl , hat hiermit eine volle Bestätigung erhalten.

12. Der Einfluß des Ammonsulfats auf den Nitratbildner (Tab. X).

Es ist eine alte Streitfrage, ob die Zellen des *Nitratbildners* durch Ammoniak geschädigt werden oder nicht. Daß freies Ammoniak (NH_3) die Nitrifikation beim *Nitratbildner* hemmt, steht außer jedem Zweifel. Anscheinend nicht zu klären ist die Tatsache, warum gerade der *Nitratbildner* in Gesellschaft mit dem *Nitritbildner* vorkommt, der unbedingt oxydierbare Ammonverbindungen zum Gedeihen und zur Zellvermehrung benötigt.

Zur Prüfung der Widerstandskraft des *Nitratbildners* dem Ammonsulfat gegenüber bei verschiedenen pH -Werten setzte ich folgenden Versuch in Erlenmeyerkölbchen mit je 25 ccm Nährlösung an. Um nicht unnötig hohe Salzkonzentrationen zu erhalten, gab ich statt 4 g $NaNO_2$ /Liter 1 g dieses Salzes zu den übrigen der *Nitrobacter*-Nährlösung. Die Abstufung der c_H geschah durch die Karbonate des Calciums, Magnesiums und Natriums. Sobald die Oxydation des Nitrits beendet war, wurden die getrennt sterilisierten Ammonsulfat- und Karbonatlösungen bzw. -aufschlemmungen zu den *Nitrobacter*-Kulturen zugefügt, und zwar derart, daß in sämtlichen Kulturen zusätzlich eine 0,1%ige Karbonatlösung und in der Hälfte der Kulturkölbchen außerdem noch eine 0,2%ige Ammonsulfatlösung entstand. Darauf wurden die Kölbchen zuparaffiniert und im Instituts Keller bei ca. 19° C aufbewahrt. Von Zeit zu Zeit impfte ich von diesen Kulturen zurück in die übliche Nährlösung für die *Nitratbildner*, um festzustellen, ob die Kellerkulturen noch lebende *Nitrobacter*-Zellen enthielten.

Tabelle X. Der Einfluß des $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ auf ausnitrifizerte Nitrobacterzellen bei gestaffelten p_{H} -Werten.

Nr.	Zahl der Tage	ohne $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$			mit 2 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ / Liter		
		Ca CO ₃	Mg CO ₃	Na ₂ CO ₃	Ca CO ₃	Mg CO ₃	Na ₂ CO ₃
1	167	L _R p_{H} 7,69	L _R p_{H} 8,47	L _R p_{H} 8,19	L _i p_{H} 7,40	T _i p_{H} 8,60	L _R p_{H} 8,20
2		L _R 7,52	L _R 8,43	L _R 8,34	L _i 7,80	T _i 8,70	T _i 8,40
3	340	L _i 7,72	L _i 8,50	L _i 8,06	L _i 7,66	T _i 8,43	T _i 8,04
4		L _i 7,77	L _i 8,68	L _i 8,38	L _i 7,59	T _R 8,89	T _i 7,80
5	746	T _R 8,00	L _i 9,02	L _i 8,80	L _i 7,66	T _R 8,00	L _i 7,69
6		T _i 7,80	L _i 8,91	L _i 8,78	T _i 8,00	T _R 8,11	T _i 7,81

i = Infektion nur mikrosk. nachweisbar

I = Infektion bereits mit bloßem Auge sichtbar

R = keine Infektion

L = Kulturen lebend

T = „ tot

Die Versuchsergebnisse bringt die Tab. X. Nach 1/2-jähriger Einwirkung der zugefügten Karbonate zeigten die Kontrollen in sämtlichen 6 Kulturen nur lebende Bakterien. Die Kulturen mit Ammonsulfat ergaben bis $p_{\text{H}} = 8,2$ lebende Tochterkulturen, bei höheren p_{H} -Werten war dagegen das Leben erloschen. Bei der 2. Rückimpfung (340 Tage) waren ebenfalls die Kontrollkulturen ausnahmslos nitrifikationsfähig. Die Ammonsulfatkulturen zeigten von $p_{\text{H}} = 7,8$ an aufwärts kein Leben. Die Kulturen mit niederem p_{H} -Wert lebten nach fast 1-jähriger Einwirkung in einer 0,2%igen ammonsulfathaltigen Nährlösung. Die Ergebnisse der 3. Rückimpfung (2 Jahre) dürften nicht mehr ganz einwandfrei zu bewerten sein, da auch unter den Kontrollkulturen bereits ein Absterben beginnt. Die Ammonsulfatkulturen zeigen bei $p_{\text{H}} = 7,69$ noch Leben. Die Kulturen mit $p_{\text{H}} = 7,81$ und höher bringen keine lebensfähigen Abimpfungen.

Sehen wir von der 3. Abimpfung ab, so können wir eindeutig die Wirkung des Ammoniaks in den Ammonsulfatkulturen verfolgen. Während die Kontrollkulturen der 1. und 2. Rückimpfung ausnahmslos nitrifizierten, brachten die Kulturen mit Zusatz von Ammonsulfat nur von einem bestimmten p_{H} -Wert an lebensfähige Abimpfungen. In der 1. Rückimpfung lag der kritische Punkt zwischen p_{H} 8,20 und 8,40, in der 2. zwischen p_{H} 7,66 und 7,80. Fügen wir die 3. Rückimpfung noch an, so lag hier der Tötungspunkt zwischen p_{H} 7,69 und 7,81. Zwischen der 1. und 2. Rückimpfung hat sich der kritische Punkt noch wesentlich verschoben, zwischen der 2. und 3. nicht. Dies dürfte viel-

leicht dahin zu deuten sein, daß bei pH 7,69 keine schädliche Wirkung vom Ammoniak mehr ausgeht.

Das NH_3 wirkt also von einer gewissen Konzentration an zweifellos tödlich giftig. Es aber deshalb als bakteriziden Stoff hinzustellen, ist meiner Meinung nach nicht richtig. Denn auch die höheren Pflanzen werden durch freies Ammoniak geschädigt. Zwischen den zarten Bakterienzellen und den meristematischen Zellen der höheren Pflanzen dürfte eine gewisse Ähnlichkeit bestehen bezüglich der Ammoniakkonzentrationen, die noch eben vertragen werden. Die Ammoniakvergiftung ist also im Reich der Organismen eine ganz allgemeine Erscheinung, der die Nitrifikationsforscher wohl deshalb zuviel Beachtung geschenkt haben, weil der *Nitritbildner*, mit dem der *Nitratbildner* stets vergesellschaftet vorkommt, zu seinem Gedeihen unbedingt Ammoniumverbindungen benötigt. Man hat aber wohl vergessen, daß für gewöhnlich die OH^- - und NH_3 -Konzentrationen im Boden nicht so groß sind, wie sie im Laboratoriumsversuch mit $CaCO_3$ oder gar $MgCO_3$ und den Ammoniumsalzen (1—2 g/Liter) uns entgegentreten. In natürlichem Boden finden wir normalerweise auch kein Nitrit, sondern Nitrat. Dies beweist, daß der *Nitratbildner* in der Nitrifikation in keiner Weise gehemmt, geschweige geschädigt wird durch Ammonverbindungen, die der *Nitritbildner* benötigt.

Mit diesem Versuch dürfte bewiesen sein, daß nicht das NH_4 -Ion, sondern das NH_3 -Molekül die *Nitrobacter*-Zellen zum Absterben bringt. Die NH_4 -Ionen scheinen völlig unschädlich zu sein. Eine Einwirkungsdauer von über 2 Jahren bei pH 7,69 und darüber vermögen *Nitrobacter* nicht abzutöten. Dagegen genügt bei pH 8,40 eine Einwirkung von rund $5\frac{1}{2}$ Monaten zur Abtötung.

13. Hunger-Kulturen.

a) Lufttrockene Komposterde.

In meiner ersten Abhandlung über nitrifizierende Bakterien (1939) berichtete ich über die lange Lebensdauer in eingetrocknetem Zustande im natürlichen Substrat, in einer Komposterde aus dem hiesigen Institutsgarten. Damals hatte ich festgestellt, daß selbst nach 3 Jahren noch lebende N-Oxydanten in der völlig staubtrockenen Komposterde sich befanden.

In den darauffolgenden 3 Jahren wurde die Untersuchung fortgeführt und alle 1—2 Monate wurden 2—6 Erlenmeyerkölbchen mit der vorhin erwähnten Komposterde beimpft. Zu dem Zwecke nahm ich 100—200 ccm fassende Kölbchen mit 25 bzw. 30 ccm Nährlösung teils für den *Nitrit*-, teils für den *Nitratbildner*. Nach der Sterilisation beimpfte ich die Nährlösung mit einem kleinen Löffel voll trockener Komposterde und stellte diese Kultur 3—4 Wochen lang in den Brutschrank bei Temperaturen zwischen 30 und $37^\circ C$. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Kulturen nach der Tüpfelmethode auf Ammoniakschwund, Nitritbildung bzw. -schwund geprüft.

In der Regel fiel das Prüfungsergebnis positiv aus. Um nun ganz sicher zu sein, habe ich in der letzten Untersuchung die getrocknete

Erde, von 50—500 mg gestaffelt, zu 20 Erlenmeyerkölbchen mit *Nitrosomonas*- bzw. *Nitrobacter*-Nährlösung gegeben. Es zeigte sich hierbei, daß in sämtlichen Kölbchen Nitrifikation eintrat. Damit dürfte eindeutig bewiesen sein, daß innerhalb von 6 Jahren die Nitrifikationskraft der Komposterde nicht erloschen war. Nach den geschilderten Versuchsergebnissen steht zu erwarten, daß die Lebenskraft der N-Oxydanten in der Trockenkomposterde in absehbarer Zeit noch nicht erschöpft ist, so daß also mit einer Nitrifikation noch auf weitere Jahre zu rechnen ist. (Leider kann dieser Versuch nicht mehr fortgesetzt werden, da am 18. 11 1944 mit dem Institut auch die getrocknete Erde vernichtet wurde.)

b) Ausnitrifizierte Nährlösung (Tab. XI).

Außer über Hungerkulturen in eingetrocknetem Zustande verfügte ich noch über zwei Kulturserien, die seit 1937 in ausnitrifizierter Nährlösung hungerten. Jede Serie bestand aus 12 Erlenmeyerkolben, die zu-paraffiniert bei Zimmertemperatur in einem Schrank aufbewahrt wurden.

Tabelle XI. Lebensdauer der Nitrifikanten
in ausnitrifizierter Nährlösung.

<i>Nitrobacter</i>			<i>Nitrosomonas</i>		
Zeitdauer in Tagen	von 12 Kulturen		Zeitdauer in Tagen	von 12 Kulturen	
	lebend	tot		lebend	tot
813	7	5	649	2	10
1255	6	6	1095	2	10
1739	1	11	1577	1	11

Der Versuch mit *Nitrobacter* war der eindeutigste: Am 5. 4. 1937 waren die Erlenmeyerkölbchen beimpft worden. Am 23. 6. 1939 erfolgte die erste Rückimpfung in normale *Nitrobacter*-Nährlösung. Am 41. Tage hatten 7 Kölbchen zu Ende nitrifiziert, 5 dagegen zeigten noch starke Nitritreaktion. Seit der Beimpfung der Stammkulturen waren 2 Jahre und 83 Tage verstrichen; trotzdem enthielt über die Hälfte der Kulturen noch soviel lebende Zellen, daß mit einer Platinöse lebende *Nitrobacter*-Zellen übergeimpft wurden.

Am 12. 9. 1940 impfte ich zum zweiten Mal (3 Jahre und 160 Tage) von diesen Kölbchen ab und fand, daß 28 Tage nach der Beimpfung die Hälfte der Kulturen nitrifizierte. Die anderen 6 Kölbchen wiesen noch starke Nitritreaktion auf.

Die dritte Abimpfung erfolgte am 9. 1. 1942. Geprüft wurde nach 21 Tagen. Das Ergebnis war, daß von den ursprünglichen 12 Kölbchen nur noch eins das gebotene Nitrit oxydiert hatte. Alle übrigen 11 schienen keine lebenden Zellen zu enthalten. Die 10 Tage später erfolgte 2. Prüfung, also am 31. Tage seit der Rückimpfung, brachte das gleiche Ergebnis. Der eine Kolben hatte somit eine Hungerperiode von

4 Jahren und 278 Tagen in nicht eingetrocknetem Zustande bei Zimmertemperatur überdauert.

Ob das Absterben der *Nitrobacter*-Zellen allein auf Verhungern der Zellen zurückzuführen ist, ist nicht unbedingt sicher. Denn dadurch, daß die Kulturen so ungewöhnlich lange aufbewahrt wurden, ließ sich eine Konzentrationserhöhung der Kulturlösung nicht vermeiden, selbst wenn die Kölbchen auch zuparaffiniert waren. Außerdem könnten die natürlich absterbenden Zellen vielleicht Stoffe ausgeschieden haben, die unter Umständen auf die lebenden Zellen wie Gifte wirken. Unter den günstigsten Bedingungen können also in Flüssigkeitskulturen *Nitrobacter*-Zellen mindestens $4\frac{1}{2}$ Jahre lebensfähig bleiben.

Bei den *Nitritbildner*-Kulturen war von Anfang an das Verhältnis zwischen lebenden und toten Kulturen weit ungünstiger. Das dürfte damit zusammenhängen, daß schon zur Zeit des Zuparaffinierens die Konzentration in den meisten Kölbchen zu hoch war. Vielleicht dürfte auch das gebildete Nitrit giftig gewirkt haben. Die erste Abimpfung brachte nach 1 Jahr und 284 Tagen nur 2 lebende Kulturen, die übrigen 10 waren tot. Die zweite Abimpfung (nach 3 Jahren) zeigte das gleiche Ergebnis. Nach 4 Jahren und 116 Tagen (dritte Abimpfung) fiel auch noch eine von den 2 lebenden Kulturen aus, so daß ich nach etwas mehr als $4\frac{1}{4}$ Jahren von der ursprünglichen Serie noch eine lebende Kultur besaß.

Aus obigem Versuch ergibt sich, daß die *Nitrifikanten* gar nicht so kurzlebig sind, wie vielfach in der Literatur angegeben wurde. Unter den günstigsten Bedingungen sind vielleicht nach 5 und noch mehr Jahren noch lebende Zellen aus Hungerkulturen zu erhalten. Ob die aus den toten Bakterien ausdiffundierenden organischen Stoffe für die lebenden von Nutzen sind, läßt sich nach den bisherigen Befunden mit organischen Lösungen nicht bejahen. Wahrscheinlicher ist, daß sie, wie Atmungsversuche ergeben haben, äußerst sparsam mit den aus CO_2 aufgebauten Kohlenstoffverbindungen umgehen und wenigstens in Zeiten, wo der oxydierbare Stickstoff fehlt, nur einen ungewöhnlich trägen Stoffwechsel zeigen.

Schlußbetrachtungen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Lebensbedingungen der *Nitrifikanten* untersucht. Bei der Prüfung der Nährsalze fiel das große Magnesium- und Phosphatbedürfnis auf. Vielleicht steht diese Erscheinung in enger Beziehung zu der enzymatischen Kohlenhydratspaltung. Nach Angaben von Lohmann (1931, a, b) und von v. Euler und Adler (1937) besteht die Co-Zymase, die den Verlauf des Kohlenhydratabbaues steuern hilft, aus einem Magnesiumsalz und der Adenylpyrophosphorsäure. Sollten für diesen Kohlenhydratabbauprozess Magnesium und Phosphat gebraucht werden, so erhielte meine Auffassung, daß auch den *Nitrifikationsbakterien* ein dissimilatorischer Stoffwechsel zukäme, eine erneute Bestätigung. Allerdings könnte das gleiche oder ein ähnliches Ferment auch am Aufbau der Kohlenhydrate beteiligt sein.

Weiterhin wäre noch zu überlegen, ob nicht das Magnesium an der CO_2 -Reduktion beteiligt ist. Es wäre denkbar, daß in der autotrophen Bakterienzelle eine farblose Variante des Chlorophylls existiert, mit deren Hilfe diese Bakterien das CO_2 -Molekül reduzieren. Vielleicht hat diese Variante eine gewisse Ähnlichkeit mit dem farblosen Mg-haltigen Protochlorophyll. Man könnte auch daran denken, daß das Phosphat zum Aufbau von Chromatin bzw. Kernäquivalenten verwendet wird.

Welcher oder ob alle erwähnten Fälle oder noch andere zutreffen, sei einstweilen dahingestellt. Sicher ist jedenfalls, daß Mg und PO_4 im Stoffwechsel der *Nitrifikanten* eine überaus wichtige Rolle spielen.

Eine nicht minder wichtige Aufgabe scheinen auch die H-Ionen und die Kohlensäure zu haben. Der Versuch über Karbonatmangel hat bewiesen, daß der *Nitratbildner* seinen CO_2 -Bedarf aus der Atmosphäre beziehen kann. Doch genügen die Mengen offenbar nicht zum normalen Ablauf der Nitrifikation. Zusatz von Karbonat zur Kulturlösung wirkt gewissermaßen als „ CO_2 -Düngung“. Aus verschiedenen Beobachtungen zu schließen, dürfte allein die gasförmige Kohlensäure (CO_2) im Stoffwechsel der *Nitrifikanten* Verwendung finden. Damit wäre die große Empfindlichkeit gegen zu hohe Alkalität erklärlich. Bei hohem pH-Wert ist die Kulturlösung relativ arm an H-Ionen und als Folge davon auch arm an CO_2 . Von einem gewissen Säuregrad an wird aus der karbonathaltigen Nährlösung CO_2 an die Kulturflüssigkeit abgegeben und damit die Nitrifikation gefördert.

Bei gleicher Bakterieneinsaat ist daher die Länge der sog. Inkubationszeit im wesentlichen von der zur Verfügung stehenden CO_2 -Konzentration abhängig. Dies haben mit aller Deutlichkeit die Kulturen mit hoher Schichttiefe bewiesen. Infolge der Ammoniakoxydation sinkt in einer *Nitrosomonas*-Kultur alsbald der pH-Wert. Dadurch gleitet die Kulturlösung spontan in einen zu sauren Bereich. Die Lebensbedingungen werden für die *Nitrifikanten* ungünstiger, wodurch sich die Nitrifikationsgeschwindigkeit mehr und mehr verlangsamt. Für ein optimales Wachstum ist beim *Nitritbildner* eine überoptimale Reaktion zu Anfang vorteilhaft. Deshalb lieferten die Kulturen mit der längsten Inkubationszeit hernach die steilsten Wachstumskurven. Mit dieser Untersuchung erklärte sich auch die Anschauung, daß der *Nitritbildner* nur das gasförmige CO_2 -Molekül zum Aufbau der Körpersubstanz verwerten kann und nicht das HCO_3 -Ion, wie manche Wasserpflanzen es tun sollen (siehe *Ruttner* 1939, S. 34).

Die eben angeführte Auffassung erklärt auch die oft gemachte Beobachtung, daß *Nitrifikanten* in Reinkulturen schlechter gedeihen als in Gesellschaft mit heterotrophen Begleitern, die CO_2 ausscheiden und die Kulturlösung damit anreichern.

Daß der *Nitritbildner* schwieriger zu züchten ist als der *Nitratbildner*, hängt sicher mit den labilen Reaktionsverhältnissen in der Kulturlösung zusammen. Beim *Nitratbildner* tritt während der Nitrifikation keine merkliche Reaktionsverschiebung ein. Der anfängliche pH-Wert der Kulturlösung bleibt während der ganzen Versuchsdauer praktisch konstant, was beim *Nitritbildner* nicht der Fall

ist. Hätte man ein Salz oder Salzgemisch, das die Anfangsreaktion während des ganzen Versuchs aufrechterhielte, so könnte man sehr wahrscheinlich mit dem *Nitritbildner* ebenso gut arbeiten wie mit dem *Nitratbildner*.

Nach meinen Versuchsergebnissen dient das Calcium nicht ausschließlich zur Abstumpfung der bei der Nitrifikation sich bildenden Säure, sondern auch zum Aufbau der Zellen. Wird kein Ca der Kulturlösung zugesetzt, so vermag die Zelle sich fürs erste zu helfen, indem sie ihren Vorrat an Calcium bei der Zellteilung streckt. Sobald aber das Ca-Minimum in der Zelle erreicht ist, kommt das Wachstum zum Stillstand und damit auch die Nitrifikation.

Die übrigen von mir untersuchten Elemente der Nährlösung werden nur in ganz geringen Mengen benötigt. Der Schwefel wird sicherlich zum Aufbau schwefelhaltiger Aminosäuren, u. a. auch für den Atmungs-vorgang benötigt. Wenn bislang auch noch keine Atmungsfermente bei den *Nitrifikanten* gefunden wurden, so ist damit noch nicht bewiesen, daß sie nicht existieren. Sehr wahrscheinlich waren die Untersuchungsmethoden noch zu grob, um diese nachzuweisen. Vieles deutet jedenfalls daraufhin, daß ein dissimilatorischer Stoffwechsel bei den autotrophen *Nitrifikationsbakterien* vorhanden ist: So z. B. die Notwendigkeit des Eisens, das Mg- und PO_4 -Bedürfnis, die O_2 -Aufnahme und die CO_2 -Abgabe, die nach dem Nitrifikationsprozeß (s. Bömeke 1939) beobachtet werden konnten.

Das Kalium-Bedürfnis des *Nitratbildners* und sehr wahrscheinlich auch des *Nitritbildners* dürfte nicht besonders groß sein. Man darf dabei allerdings nicht vergessen, daß die *Nitrifikanten* in einer verhältnismäßig großen Nährlösungsmenge nur wenig Bakterienzellen bilden. Doch möchte ich meinem Versuchsergebnis bezüglich des Kaliums nicht allzu große Bedeutung beilegen, weil aus dem Jenaer Gerätéglass vielleicht genügend Kalium für den Aufbau- und Betriebsstoffwechsel abgegeben wurde.

Die Hemmungen durch überdosierte N-Gaben sind nicht auf osmotische Wirkungen zurückzuführen. Daß *Meyerhof* weit höhere Maximalwerte fand, hat zweierlei Gründe: Einmal führte er seine Versuche unter weniger natürlichen Bedingungen mit angereicherten Kulturen durch; zum anderen arbeitete er in mehr alkalischem Gebiet. Im sauren Milieu werden nach Angaben von *Mevius* und *Dikussar* Maiswurzeln durch Nitrite stärker geschädigt als in alkalischem. Dieser Befund läßt sich wahrscheinlich auch auf die Zellen der *Nitrifikationsbakterien* ausdehnen. Damit wäre eine Erklärung dafür gefunden, daß *Meyerhof* (1916 b) etwa die fünffache Nitritmenge geben konnte, um die gleiche Hemmung zu erzielen, wie ich sie fand.

Manchmal begegnet man in der Literatur der Anschauung, daß während der Nitrifikation stets Nitrit als Zwischenprodukt auftreten müßte. Durch einen Versuch mit einem Zusatz von Indigocarmin konnte diese Anschauung widerlegt werden. Läßt man nämlich in einer Nitrifikationsnährlösung gleichzeitig den *Nitrit-* und *Nitratbildner* nitrifizieren, so entfärbt sich das Indigo nicht, d. h. es tritt keine freie salpe-

trige Säure auf, während der *Nitritbildner* das Ammoniak oxydiert, wenn gleichzeitig der *Nitratbildner* in der Kulturlösung vorhanden ist.

An dieser Stelle sei auch darauf hingewiesen, daß der *Nitratbildner* nicht durch NH_4 -Ionen, sondern nur durch freies NH_3 geschädigt wird. Bereits in meiner früheren Veröffentlichung (1939) habe ich darauf hingewiesen, daß wir zwischen NH_4 -Ionen und NH_3 -Molekülen unterscheiden müssen.

Die Verlangsamung, welche die Nitrifikation durch Kolloidzusatz erfährt, könnte vielleicht damit im Zusammenhang stehen, daß die Kolloide sich wie eine Schutzschicht um die Moleküle bzw. Ionen des Nährsubstrats legen und dadurch die Nitrifikation erschweren. Man würde die Kolloide dann besser als Katalysatorgifte bezeichnen. Ob auch die schädliche Wirkung der löslichen organischen Substanzen ebenfalls auf die gleiche Ursache zurückzuführen ist, sei dahingestellt. Sicher ist jedenfalls, daß sowohl die löslichen organischen Verbindungen wie die Kolloide des Agars und die Kieselsäure den Nitrifikationsgang des *Nitrit-* und auch des *Nitratbildners* verlangsamen. Die Angaben *Rippels* (1936) über den günstigen Einfluß des Agars auf heterotrophe Mikroorganismen läßt sich auf autotrophe Nitrifikationsbakterien nicht ausdehnen. Hier liegen höchstwahrscheinlich ganz andere Vorgänge zugrunde.

Wie lassen sich nun meine Versuchsergebnisse mit den in der Natur gemachten Beobachtungen in Einklang bringen? Bei meinen Reaktionsbestimmungen erwies sich, daß unterhalb $\text{pH} = 5$ keine Nitritbildung mehr möglich ist. Wenn aber der *Nitritbildner* kein Nitrit produziert, kann auch der *Nitratbildner* nicht nitrifizieren. Das läuft praktisch darauf hinaus, daß bei einer Bodenreaktion $\text{pH} < 5$ keine biogene Salpeterbildung möglich ist, wenn im Boden dieselben Lebensbedingungen wie im Kulturkolben herrschen. Man findet aber verschiedentlich in der Literatur Angaben über Nitrifikation bei $\text{pH} = 3-4$ [vgl. *Voß* und *Ziegenspeck* (1928), *A. Harder* (1931)]. In diesen Fällen könnten entweder andere Mikroorganismen oder anorganische N-Oxydationen vorgelegen haben, welche die Nitrifikation bewirken. In Erwägung zu ziehen wäre ferner, daß der Boden nie eine homogene Masse ist. Es können im Boden Inseln mit anderer Reaktion als die der Hauptmasse enthalten sein, die den *Nitrifikanten* Leben und Vermehrung ermöglichen. Wesentlicher als die oben angeführten Gründe ist m. E., daß im Boden eine große Anzahl Organismen lebt, die CO_2 ausscheiden. Der lebende Boden ist in der Regel CO_2 -gesättigt. Die *Nitrifikanten* finden also auch in einem sauren Boden bei einer Reaktion noch hinreichend viel CO_2 , bei der in einer Reinkultur ein Leben infolge CO_2 -Mangels nicht mehr möglich ist. Wie wäre es sonst denkbar, daß bei pH -Werten unter 5 noch Nitrat gebildet werden könnte?

Da im Boden zuerst der *Nitritbildner* oxydieren muß, bevor der *Nitratbildner* Salpeter bilden kann, ist es auch merkwürdig, daß bei einer Temperatur von 10°C beim *Nitritbildner* in Reinkultur so gut wie keine Nitrifikation beobachtet werden konnte, während in Böden zwischen 0 und 3°C noch Salpeterbildung stattfinden soll. Ebenso

deutet das Salpetermaximum im Frühjahr auf eine Ammoniakoxydation im Winter hin. Man könnte hier wiederum an eine abiogene Salpeterbildung denken oder an Mikroorganismen, die bei niedriger Temperatur nitrifizieren. Doch der wahre Grund der Salpeteranhäufung im Boden während der kalten Jahreszeit ist wohl der, daß im Winter die Hauptkonsumenten des Salpeters, die grünen Pflanzen, in Kältestarre verharren und während dieser Zeit keine nennenswerten Nitratmengen aufnehmen. Wird im Winter auch bedeutend langsamer nitrifiziert, so dürften sich doch im Laufe der Monate Nitrate anhäufen. Mit dieser Anschauung könnte auch das Salpetervorkommen in den Tundren erklärt werden.

In der Literatur über *Nitrifikationsbakterien* ist die Ansicht verbreitet, daß diese recht kurzlebig sind. (Vgl. *Boltjes, Hes, Fred* und *Davenport* u. a. m.) Mein Untersuchungsergebnis dürfte dieser Anschauung widersprechen. Wenn in einem staubtrockenen Boden nach 6 Jahren in einer kleinen Menge von 50 mg Boden noch lebende Nitrifikationskeime enthalten sind und die Nitrifikationskraft keineswegs den Anschein erweckt, daß sie im Erlöschen begriffen ist, kann man diesen Organismus nicht kurzlebig nennen. Wenn selbst in Flüssigkeitskulturen nach 3—4 Jahren noch nitrifizierfähige Abimpfungen zu erhalten sind, so müssen wir auch in dieser Hinsicht unsere Vorstellung ändern. Die negativen Ergebnisse sind anscheinend von Kulturen unter ungünstigen Lebensbedingungen gewonnen.

Aus obigen Überlegungen ist der Schluß zu ziehen, daß unsere Laboratoriumsversuche nicht ohne weiteres mit den Ergebnissen in der Natur übereinzustimmen brauchen. Erst bei gründlicherer Durcharbeitung lösen sich die scheinbaren Widersprüche.

E. Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse.

1. In Nährlösungen mit den reinsten Chemikalien und destilliertem Wasser ist die Nitrifikation gehemmt. Mg- und PO_4 -Ionen benötigen die *Nitrifikationsbakterien* in größeren Mengen; von den übrigen Elementen genügen bereits Spuren.
2. Als maximale Gaben oxydierbarer N-Verbindungen, die ohne wesentliche Störung nitrifiziert werden, wurden für den *Nitritbildner* 8 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /Liter und für den *Nitratbildner* ebenfalls 7—8 g NaNO_2 /Liter gefunden.
3. Das Temperaturintervall des *Nitritbildners* ist enger und sein Optimum liegt höher als beim *Nitratbildner*.
4. Kolloide des Agars und der Kieselsäure verzögern die Nitrifikation. Weniger die organische Natur des Agars als vielmehr der kolloidale Zustand stört den Nitrifikationsablauf.
5. Trotz vergrößerter Schichttiefe wird eine 0,1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ enthaltende Nährlösung schneller nitrifiziert als eine 0,2%ige.
6. In Neutralrot wurde ein für den *Nitritbildner* brauchbarer Indikator gefunden, der makroskopisch den Beginn der Nitrifikation in Flüssigkeitskulturen anzeigt. Als organische Substanz scheint

- Neutralrot den Nitrifikationsablauf des *Nitritbildners* und im geringeren Maße auch des *Nitratbildners* zu hemmen.
7. In Erlenmeyerkolben mit hoher Schichttiefe wurden Schwärmstadien des *Nitritbildners* beobachtet.
 8. Mittels Indigocarmins konnte nachgewiesen werden, daß während der Nitrifikation in den *Nitritbildner*-Kulturen keine größere Menge Nitrit auftritt, wenn gleichzeitig der *Nitratbildner* zugeimpft wird, d. h. mit andern Worten: Trotz Gegenwart von Ammonsulfat vermag der *Nitratbildner* ohne merkliche Verzögerung zu nitrifizieren.
 9. In einer 0,4% Calciumkarbonat enthaltenden Nährlösung treten beim *Nitritbildner* die geringsten N-Verluste auf.
 10. Unterhalb pH 5 konnte beim *Nitritbildner* in Nährlösung keine Nitrifikation nachgewiesen werden. Durch Erhöhung der Schichttiefe trat stärkere Ansäuerung der Nährlösung und damit Verzögerung der Nitrifikation ein. In der sog. logarithmischen Phase erfolgte etwa alle 15½ Stunden eine Zellteilung des *Nitritbildners*.
 11. Das Chlorid des Ammonsalzes wird wesentlich schlechter nitrifiziert als sein Sulfat.
 12. Nicht das NH_4 -Ion, sondern das NH_3 -Molekül wirkt nachteilig auf *Nitrobacter*.
 13. Nach sechsjährigem Hungern in staubtrockenem Boden und nach dreijährigem Hungern in ausnitrifizierter Kulturlösung waren die *Nitrifikationsbakterien* nicht abgestorben.

Literatur.

- Boltjes*, K.: Arch. f. Mikrobiologie **6**, 79, 1935. — *Bömeke*, H.: Arch. f. Mikrobiologie **10**, 385, 1939. — *Cyplenkin*, E. I. und *P. G. Schilin*: Ref. im Ztbl. für Bakteriologie II **95**, 438, 1936. — *Engel*, H.: Arch. f. Mikrobiologie **1**, 436, 1930. — *Derselbe*, *Planta* **12**, 60, 1931. — *Engel*, H. und *W. Skallau*: Ztbl. f. Bakteriologie II **97**, 305, 1937. — *Euler*, H. v. und *E. Adler*: Ztschr. f. physiolog. Chem. **246**, 83, 1937. — *Fred*, E. B. und *A. Davenport*: Soil Science **11**, 389, 1921. — *Gauger*, W. und *H. Ziegenspeck*: Bot. Archiv **27**, 247, 1929. — *Geitler*, L.: Grundriß der Cytologie, Berlin 1934. — *Harder*, A.: Bot. Archiv **31**, 312, 1931. — *Hes*, J. W.: Rec. des trav. bot. néerl. **34**, 233, 1937. — *Heubült*, J.: *Planta* **8**, 398, 1929. — *Lohmann*, K.: Bioch. Ztschr. **237**, 45, 1931 a. — *Derselbe*: Bioch. Ztschr. **241**, 67, 1931 b. — *Meyerhof*, O.: Pflügers Archiv **164**, 353, 1916 a. — *Derselbe*: Pflügers Archiv **165**, 229, 1916 b. — *Derselbe*: Pflügers Archiv **166**, 240, 1917. — *Mevius*, W. und *J. Dikussar*: Jahrb. f. wiss. Botanik **73**, 633, 1933. — *Nelson*, P. H.: Ztbl. f. Bakteriologie II, **83**, 280, 1931. — *Omeliński*, W.: Ztbl. f. Bakteriologie II, **5**, 473, 1899. — *Rippel* A.: Arch. f. Mikrobiologie **7**, 210, 1936. — *Rubentschik*, W.: Ztbl. f. Bakteriologie II, **77**, 1, 1929. *Ruttner*, F.: Verlag de Gruyter, Berlin 1940. — *Schloesing*, Th. und *A. Müntz*: Compt. rend. Acad. Sc. Paris **86**, 1879. — *Schönbrunn*, B.: Ztbl. f. Bakteriologie II, **56**, 545, 1922. — *Schumacher*, W. in Strasburger: Lehrbuch der Botanik, 22. Aufl., Jena 1944. — *Voß*, H. und *H. Ziegenspeck*: Bot. Arch. **25**, 214, 1928. — *Warrington*, zit. bei *Harder*: Bot. Arch. **31**, 340, 1931. — *Winogradsky*, S.: in Lafars Handbuch der technischen Mykologie **3**, 132, 1906.

(Aus den Botanischen Anstalten der Universität Göttingen)

Erfahrungen und Bemerkungen zum Phycomyces-Test auf Vitamin B₁

Von

Hans v. Witsch.

Mit 2. Textabbildungen.

(Eingegangen am 7. Oktober 1947.)

Im Zusammenhang mit Arbeiten, die sich mit der Stoffproduktion autotropher Mikroorganismen befaßten (Harder und v. Witsch 1942a und b), war auch die Frage nach deren Gehalt an Wirkstoffen aufgetreten. Entsprechende Untersuchungen über das Vorkommen von Aneurin wurden mit Hilfe des *Phycomyces*-Testes ausgeführt. Über hierbei gewonnene Erfahrungen bei der Durchführung des Testes soll im Folgenden berichtet werden.

Der Riesenschimmel *Phycomyces Blakesleeanus* wurde von Schopfer und Jung (1938, dort auch weitere Literatur) als Testorganismus für die Aneurinbestimmung eingeführt und seine Eignung hierfür durch zahlreiche Untersuchungen bewiesen. Zuletzt hat sich Thren (1941) mit dieser Frage beschäftigt und eingehende Arbeitsvorschriften für die quantitative Durchführung des Testes gegeben. Im Laufe der vorliegenden Untersuchungen gewonnene Erfahrungen zeigten jedoch, daß der von Thren vorgeschlagene Weg nicht in allen Fällen gangbar ist und daß durch gewisse Änderungen in der Versuchstechnik noch verläßlichere Resultate gewonnen werden können.

Es erübrigt sich, die Versuchsanstellung in allen Einzelheiten eingehend zu schildern, dies ist bereits in den oben angeführten Arbeiten von Schopfer und Jung bzw. Thren geschehen. Hier sei nur kurz der Gang der Untersuchungen skizziert und im Anschluß daran die Abweichungen von der durch Thren vorgeschlagenen Methodik näher begründet und erläutert.

Alle Kulturen wurden in 100 ccm-Erlenmeyerkolben aus Jenaer Glas 20 angesetzt; jeder Kolben enthielt 20 ccm der von Schopfer (1939) angegebenen Nährlösung mit verschiedenen Zusätzen von Pflanzenextrakt bzw. von reinem kristallisiertem Aneurin (Merck). Auf eine Änderung im Ansatz der Grundnährlösung, die aus praktischen Gründen notwendig wurde, wird weiter unten noch eingegangen. Es wurden stets gleichzeitig 4 Konzentrationsstufen der zu prüfenden Extrakte und 6—7 Vitaminkonzentrationen angesetzt. Jede Stufe bestand aus 5 Einzelkolben. Die höchsten Konzentrationen wurden durch Vermischen des zu prüfenden Pflanzenextraktes bzw. der Vitaminlösung mit der gleichen Menge doppelt konzentrierter Nährlösung hergestellt. Durch Zusammengießen dieser Ausgangskonzentrationen mit gleichen Teilen normaler Nährlösung wurden die niedrigeren Konzen-

trationen in geometrischer Verdünnung hergestellt. Sterilisiert wurde zweimal je 30 Minuten im Dampftopf, beimpft mit je 1 Tropfen einer schwachen Sporensuspension in sterilem doppelt destilliertem Wasser. Zu ihrer Herstellung wurden aus einer Agarstammkultur einige Sporangien mit der Platinnadel entnommen und im Wasser verteilt. Einfaches Abschweimen der Sporen aus dem Agarröhrchen kann unter Umständen Wirkstoff mit übertragen und eine zu hohe Lage des Anfangspunktes der Testkurven bedingen. Die Kulturen standen bei Zimmertemperatur im diffusen Tageslicht, die Kulturdauer betrug je nach der Jahreszeit 10—11 Tage. Zur Auswertung wurden die einzelnen Mycelien nach 4stündiger Trocknung bei 105° gewogen und aus den je 5 Einzelwerten jeder Stufe das durchschnittliche Gewicht berechnet. An Hand der Testkurve jeder Versuchsreihe, gewonnen aus den Vergleichsserien mit Zusatz von reinem Vitamin B₁, wurden aus den mittleren Erntegewichten der 4 Extraktkonzentrationen die B₁-Werte der geprüften Probe auf 1g Trockengewicht berechnet. Der Mittelwert aus den Einzelbestimmungen der 4 Konzentrationsstufen wurde dann als der Vitamingehalt des betreffenden Objektes angegeben.

Soweit in kurzen Zügen der Gang der Versuche. Etwas näher müssen noch die folgenden Punkte besprochen werden, in denen sich Abweichungen von dem durch *Thren* vorgeschlagenen Verfahren als günstig erwiesen hatten.

Die Nährlösung. Die Nährlösung enthält als Kohlenstoffquelle Glykose. Da diese nicht in der nötigen Menge zur Verfügung stand, mußte im Laufe der Untersuchungen nach einem Ersatz gesucht werden. Es zeigte sich in zahlreichen Versuchen, daß Rohrzucker in Form von reinem weißem Kristallzucker fast ebenso gut verwendet werden kann. Nur in seltenen Fällen enthielt er als Verunreinigung Spuren von Wirkstoffen, welche ein kümmerliches Mycelwachstum auch ohne Zusatz von Vitamin B₁ ermöglichten. Es wurde jedoch im Gegensatz zu *Thren*, wie weiter unten noch näher ausgeführt wird, auch aus anderen Gründen zu jedem Versuche gleichzeitig noch eine Vergleichs- und Kontrollserie mit zusatzfreier Nährlösung bzw. mit abgestuftem Vitaminzusatz angesetzt. Dadurch konnten etwaige Fehler, bedingt durch unreinen Zucker, stets sicher erkannt und vermieden werden. Die verwendete Grundnährlösung hatte demnach folgende Zusammensetzung: Doppelt destilliertes Wasser 1000 ccm, Rohrzucker 30 g, Asparagin 1 g, MgSO₄ · 7H₂O 0,5 g, KH₂PO₄ 1,5 g. Ohne Zusatz von Vitamin entwickelten sich in ihr stets nur einzelne kleine Flöckchen von untergetauchtem Mycel mit einem Trockengewicht von 0,2—6,3 mg je Kolben. Meistens lagen die Erntegewichte zwischen 3 und 6 mg, bei Verwendung einer besonders günstigen Rohrzuckerprobe ergaben sich Gewichte von 0,2—2,4 mg. Diese Werte liegen durchaus im Rahmen der auch bei Verwendung von reiner Glykose gefundenen Zahlen, die nach eigenen Erfahrungen und nach *Schoppers* Angaben zwischen 2 und 5 mg liegen.

Die Herstellung der Extrakte. Die Extraktion des zu prüfenden Materials erfolgte in der üblichen Weise durch einstündiges Kochen im Dampftopf. Die Ergebnisse waren gleichmäßiger, wenn zum Extrahieren nicht frisches, sondern im Trockenschrank bei 105°

getrocknetes Material verwendet wurde. Manche *Algenarten* enthalten offenbar Stoffe, welche die Entwicklung von *Phycomyces* stören. Diese Hemmstoffe wurden in vielen Fällen durch die Trocknung unwirksam. Bei vielen anderen *Algenarten* ergaben sich keine Unterschiede zwischen der Verarbeitung von frischem und von getrocknetem Material, doch wurde im Interesse möglichst einheitlicher Versuchsbedingungen die Trocknung auch bei diesen Formen durchgeführt. Zur Extraktion wurde die trockene Algenmasse mit etwas doppelt destilliertem Wasser nach schwachem Ansäuern mit KH_2PO_4 -Lösung im Achatmörser zu einem feinen Brei verrieben und dann nach Zusatz der für den späteren Versuch notwendigen Wassermenge in den Dampftopf gebracht.

Eine Zerstörung der einzelnen Algenzellen beim Verreiben, wie sie durch Zusatz von geglühtem Kieselgur erreicht werden konnte, hatte keinen Einfluß auf die Ergebnisse. Die Extraktion war auch ohne dies praktisch erschöpfend. Nach der Extraktion wurden die Extrakte durch Zentrifugieren vom Rückstand getrennt und die einzelnen Serien in der eingangs erwähnten Weise angesetzt und beimpft.

Die Bestimmung der Myceltrockengewichte. Abweichend von *Thren*, der die Mycelien auf tarierte Filter bringt, trocknet und wiegt, wurde hier der Inhalt der einzelnen Kolben in feinen Sieben aus Messingdraht aufgefangen. Die Mycelien wurden darin zuerst in Leitungswasser, dann in destilliertem mehrmals gründlich gespült. Die gespülten Mycelien wurden in den Sieben mit einer Pinzette aufgenommen, zusammengeknäult und durch vorsichtiges Ausdrücken auf mehreren Lagen Filtrierpapier vom anhaftenden Wasser befreit. Dann kamen sie in Wiegegläsern in den Trockenschrank und wurden bei 105° durch 4 Stunden getrocknet.

Die Mycelien stellen außer bei ganz geringen Wirkstoffkonzentrationen zusammenhängende Massen dar, die leicht und verlustlos als Ganzes verarbeitet werden können. Auch die Ernten der niedrigsten Konzentrationsstufen lassen sich bei einiger Sorgfalt auf diese Weise behandeln, ohne daß Mycelflöckchen verlorengehen. Nicht erfaßt wird bei dieser Methode nur ein Teil der reifen Sporen bei kräftig gewachsenen Serien. Doch dieser Verlust ist gewichtsmäßig so gering, daß er praktisch überhaupt keine Rolle spielt und durch die Vorteile des Verfahrens reichlich aufgewogen wird.

Die trockenen Mycelien sind kaum hygroskopisch. Sie haften, wenn sie nur gut gespült worden waren, nicht am Glase, so daß ohne weiteres alle 5 Ernten einer Konzentrationsstufe gemeinsam in einem Wiegegläschen getrocknet und die Mycelien nach dem Auskühlen im Exsikkator einzeln und ohne Wiegeglas auf einer guten Dämpfungswaage gewogen werden konnten. Hierdurch wurden Fehler, die durch die starke Hygroskopizität exsikkatortrockener Filter leicht eintreten können, vollkommen vermieden. Da die Mycelien auf 0,5 mg genau gewogen werden sollten, ein trockenes Filter von 9 cm Durchmesser an der Luft in kürzester Zeit aber mehrere mg Gewichtszunahme zeigen kann, sind Wiegefehler bei der Verwendung von Filtern fast nicht zu vermeiden, falls nicht jede Probe einzeln im Wiegeglas gewogen werden

kann. Dies würde jedoch bei Versuchen mit mehreren 100 Einzelkolben eine recht umfangreiche Ausrüstung an Trockenschränken, Exsikkatoren und Wiegegläsern erfordern. Diese Schwierigkeiten werden durch die vorgeschlagene Erntemethode vermieden. Ein getrocknetes Pilzmycel von 63 mg Gewicht zeigte nach 5 Minuten langem Liegen an der Luft nur 0,2 mg Gewichtszunahme.

Die Testkurve. Die Auswertung der Versuche erfolgt so, daß die nach Zusatz von Extrakten erzielten Myceltrockengewichte an Hand einer Testkurve in Aneurinwerte umgerechnet werden. Die Testkurve wird erhalten, indem in einer besonderen Serie zur Grundnährlösung reines Vitamin B₁ in steigender Konzentration zugesetzt wird und die entsprechenden Myceltrockengewichte festgestellt werden. *Thren* verwendet als Bezugsbasis eine ein für alle mal aufgestellte Standard-Testkurve, da er gefunden hatte, daß zu verschiedenen Zeiten durchgeführte Kontrollserien stets übereinstimmende Erntegewichte ergaben und die Versuche gegen Schwankungen der Zimmertemperatur weitgehend unempfindlich waren.

Nach den Erfahrungen, die bei den vorliegenden Untersuchungen gemacht wurden, welche unter Verwendung des (+)-Stammes der im Göttinger Institut vorhandenen *Phycomyces*-Kulturen ausgeführt worden sind, erschien es unumgänglich notwendig, zu jeder Versuchsgruppe auch gleichzeitig eine eigene Bezugsserie anzusetzen und die Versuche auf diese zu beziehen. Dies dürfte sich wohl grundsätzlich immer empfehlen, denn auch *Schopfer* (1941) stellte in seinen Bemerkungen zu *Threns* Arbeit fest, daß gewisse Schwankungen in der Wachstumsintensität auch bei konstanten Außenbedingungen unvermeidbar sind und daher der Bezug verschiedener Versuchsgruppen auf eine einmal aufgestellte Standard-Testkurve zu Fehlresultaten führen kann. Dies gilt um so mehr, wenn die Versuche im Zimmer, also in einem nicht temperaturkonstanten Raume, aufgestellt werden und die Arbeiten sich über längere Zeiträume erstrecken.

In Abb. 1 sind die Kurven der Myceltrockengewichte bei abgestufter Aneurinkonzentration von 3 Versuchen wiedergegeben, die sich

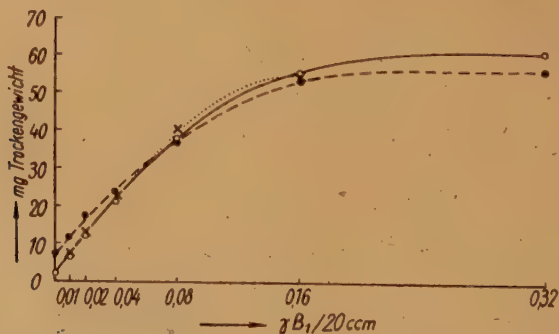


Abb. 1. Testkurven von 3 Versuchen, geerntet am 6.8.45 (● = gestrichelte Linie), 2.1.46 (○ = ausgezogene Linie) und 9.4.47 (× = punktierte Linie).

auf einen Zeitraum von über einem Jahr verteilen. Sowohl das erzielbare Höchstgewicht bei optimaler B₁-Konzentration wie vor allem der Verlauf der Kurven im ansteigenden Teil weisen für die einzelnen Kurven recht erhebliche Schwankungen auf, die die Verwendung einer gemeinsamen Bezugsbasis für alle Versuche mit Fehlern belasten würde.

Diese Schwankungen können keinesfalls auf verschiedenen Wirkstoffgehalt des verwendeten Rohrzuckers zurückgeführt werden, denn dies würde sofort, wie bereits oben erwähnt, an stärkeren Unterschieden der Erntegewichte der Kontrollserien ohne Wirkstoffzusatz zu erkennen sein. *Schopfer* (1941) führt solche Unregelmäßigkeiten auf unvermeidbare Unterschiede im Gehalt an stark wirksamen Spurenelementen in verschiedenen Nährlösungsansätzen zurück. Er berichtet von Erntesteigerungen bis zu 15%, die hierdurch bedingt sein können. Abgesehen von diesen auf der Wirkung von Spurenelementen beruhenden Schwankungen können doch auch, wie sich öfters beobachten ließ, Änderungen in der Zimmertemperatur während der Kultur auf die Erntegewichte von Einfluß sein, und zwar vor allem bei den suboptimalen Vitamin- bzw. Extraktzusätzen, welche an sich für die Auswertung der Versuche am geeignetsten sind.

Die Auswertung der Versuchsreihen. In Übereinstimmung mit *Thren* zeigte sich auch hier, daß gerade jene Extraktkonzentrationen die verlässlichste Auswertung erlauben, welche suboptimalen Vitaminmengen entsprechen. Man ist in jenem Bereich sicher, daß wirklich nur das Vitamin als begrenzender Faktor für das Pilzwachstum wirkt und Stickstoff (Asparagin) noch im Überschuß vorhanden ist. Nähert man sich jedoch der optimalen Wirkstoffkonzentration, so kann, wie im Einzelnen bei *Thren* näher ausgeführt ist, auch eine Erhöhung der Stickstoffkonzentration zu einer Steigerung des Pilzwachstums führen. Der Zusatz stärkerer Extraktkonzentrationen, wie er bei vitaminarmen Substanzen durchaus notwendig sein kann, kann aber durchaus zu einer merklichen Vermehrung des Gehaltes an organischem Stickstoff führen, da die Grundnährlösung an sich arm an solchem ist. Eine Erhöhung der Ausgangskonzentration der Nährlösung an Asparagin hat aber nach *Schopfer* unregelmäßigeres Wachstum und stärkere Streuung der Erntegewichte zur Folge.

Im Laufe der Untersuchungen kamen Fälle vor, wo bei den höchsten Extraktkonzentrationen Mycelgewichte gefunden wurden, die etwas über den mit reinen Vitaminzusätzen erzielbaren Maximalgewichten lagen. Dies legte den Verdacht einer derartigen Stickstoffwirkung nahe. Um die Frage zu klären und die Verlässlichkeit der Methode nochmals zu überprüfen, wurden Versuche angesetzt, bei denen mit der normalen Testserie eine weitere mit denselben Vitaminkonzentrationen, aber mit einer Erhöhung des Asparaginzusatzes in der Grundnährlösung verglichen wurde. Als Vitaminstufen wurden Zusätze von 0,00, 0,01, 0,02, 0,04, 0,08, 0,16 und 0,32 γ je 20 ccm Nährlösung verwendet. Die Asparaginkonzentration der einen Serie wurde um 4,4% von 20 mg je Kolben auf 20,87 mg erhöht, dies war ein Mehr-

faches von dem, was in den höchsten Extraktkonzentrationen im ungünstigsten Falle an organischem löslichem Stickstoff zugeführt wurde. Abb. 2 zeigt das Ergebnis dieser Versuche. Bis zu Erntegewichten von

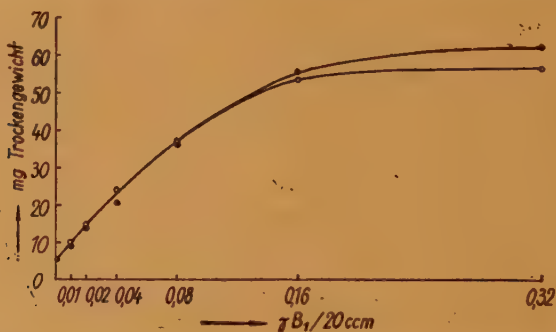


Abb. 2. Erntegewichte bei normalem (○) und bei erhöhtem (●) Asparagingehalt.

etwa 45 mg, entsprechend etwa 0,1 γ Aneurin je Kolben, macht der Zusatz überhaupt nichts aus, dann tritt eine leichte Erhöhung der Mycelgewichte ein. Es sind also gerade die suboptimalen Zusätze, welche die verlässlichsten Resultate ergeben. Es wurden daher stets nur jene Versuchsserien zur Auswertung herangezogen, welche Ernten unter 45 mg ergaben.

Die Kurven der Abb. 2 zeigen das Ergebnis im Überblick. Um ein Bild von der Verlässlichkeit derartiger Messungen zu geben, sind in Tab. I die Erntegewichte der 5 Kolben jeder Vitaminkonzentration im Einzelnen wiedergegeben. Außerdem sind noch 2 Versuche angeführt, in welchen stichprobenweise nicht nur der Stickstoff-, sondern auch der Phosphatgehalt (von 30 mg auf 32 mg je Kolben) erhöht worden war. Es zeigte sich erwartungsgemäß, daß dies auf das Erntegewicht ohne Einfluß ist.

Zur Prüfung der Brauchbarkeit der Methode wurden auch einige Bestimmungen an Objekten ausgeführt, deren Vitamin B₁-Gehalt aus der Literatur bekannt und vor allem im Tiertest ermittelt worden war. Auf die großen Differenzen von z. T. 100—200% beim Vergleich der Angaben verschiedener Autoren ist bereits an anderer Stelle (v. Witsch 1947) hingewiesen und eine mögliche Ursache dafür angegeben worden. Nach Stepp-Kühnau-Schroeder besitzt Wirsing in rohem Zustand einen Aneurin Gehalt von 120—160 γ je 100 g. Der Phycomyces-test ergab 130 γ bei der Extraktion von frischem, 85 γ bei der Verarbeitung von vorher getrocknetem Material. Der Wert für frischen Wirsing stimmt also bestens überein, die Trocknung vor der Extraktion hatte hier im Gegensatz zu den Befunden an *Algen* ein Absinken des Wertes zur Folge. Für Weizen ergab der Phycomycestest 380 γ, dies liegt unter dem aus der Literatur bekannten Gehalt von 480 γ bei Lehnartz bzw. 450—650 γ bei Stepp-Kühnau-Schroeder.

Tabelle I. Einzel- und Mittelwerte der Erntegewichte von *Phycomyces* (in mg) bei normalem und bei erhöhtem Asparagingehalt sowie bei Erhöhung der Asparagin- und Phosphatkonzentration

Vitaminskonzentration								
	0,00	0,01	0,02	0,04	0,08	0,16	0,32	0,64
Lösung	M=5,4 ¹⁾	9,5	14,0	24,0	39,0	55,0	55,0	57,5
		10,5	16,5	24,5	36,5	56,0	60,0	59,0
		10,0	14,5	25,0	37,0	54,5	53,0	59,5
		11,5	15,5	25,0	40,5	50,0	58,0	52,0
		10,5	14,0	24,0	34,5	51,0	— ²⁾	55,0
		M=10,4	M=14,9	M=24,5	M=37,5	M=53,3	M=56,5	M=56,6
hinter Aspa- ginzusatz	—	9,0	15,0	20,5	35,5	57,5	59,5	—
		9,5	13,5	22,0	33,5	52,5	61,5	
		8,5	13,0	19,5	38,0	53,0	65,5	
		9,0	12,5	21,0	40,0	53,5	63,0	
		9,5	— ²⁾	22,0	34,5	61,5	— ²⁾	
		M=9,1	M=13,5	M=21,0	M=36,3	M=55,6	M=62,4	
hinter Aspa- - und Phos- phatzusatz	—	—	—	—	57,5	63,5	—	
					53,0	61,5		
					54,0	61,5		
					56,0	65,0		
					56,5	62,0		
					M=55,4	M=61,8		

¹⁾ Mycelspuren aller 5 Kolben gemeinsam geerntet

²⁾ Kolben durch Fremdinfektion ausgefallen.

Die Ausnutzung des dargebotenen Aneurins durch *Phycomyces*. Schopfer (1939) bespricht in seiner umfassenden Darstellung auch die quantitativen Zusammenhänge zwischen gebotener Aneurinmenge und erzielter Mycelmasse. Er definiert jene Aneurinmenge, welche den Pilz in die Lage versetzt, unter genau definierten Versuchsbedingungen bei optimaler Vitamindosis 1 mg Trockenmasse zu erzeugen, als eine *Phycomyces*einheit und sieht diese Größe als biologische Konstante an. Ihr Wert liegt nach den Untersuchungen Schopfers bei 5 *my* und kann zwischen 4 und 6 *my* schwanken. Da suboptimale Vitaminskonzentrationen vom Pilz vollkommener ausgenutzt werden können, ergeben sich für niedrigere Wirkstoffmengen günstigere Verhältnisse zwischen Vitaminmenge und Erntegewicht.

Die Aufstellung einer wohldefinierten *Phycomyces*einheit könnte vielleicht den Gedanken aufkommen lassen, das Testverfahren dadurch zu vereinfachen, daß ohne Ansetzen jedesmaliger Vergleichsserien mit reinem Vitamin direkt aus den Myceltrockengewichten auf den Aneurin- gehalt der geprüften Substanzen geschlossen würde. Dies scheitert jedoch daran, daß die *Phycomyces*einheit nur für optimalen Wirkstoff- zusatz gilt, die optimale Konzentration jedoch selbst bei Ansatz zahl- reicher Verdünnungsstufen kaum so scharf erfaßt werden kann, daß

sie als verlässliche Berechnungsgrundlage für die Auswertung dienen könnte. Außerdem ist ihre Größe schon nach den Angaben *Schopfers* von Fall zu Fall etwas verschieden und kann unter Umständen noch stärker differieren, wie der folgende Abschnitt zeigt.

Berechnet man in den vorliegenden Untersuchungen das Verhältnis zwischen optimaler Vitaminmenge und Erntegewicht, so ergeben sich stets wesentlich niedrigere Zahlen. Für den in Abb. 2 wiedergegebenen Versuch mit Normallösung z. B. folgt bei einer optimalen Aneurinkonzentration von 0,17% und einer Trockengewichtsernte von 54,0 mg ein Wert von 3,1 als Phycomyceseinheit. Zahlreiche weitere Versuche ergaben im Mittel 2,9, die Einzelwerte lagen zwischen 2,0 und 3,5.

Nun wichen allerdings aus praktischen Gründen die hier angewandten Versuchsbedingungen von den *Schopferschen* etwas ab. Doch weder der Ersatz der Glykose durch Rohrzucker, noch der Umstand, daß die Kulturen im Zimmer, also nicht bei konstanter Temperatur, standen, können für diesen Unterschied verantwortlich gemacht werden, wie daraufhin angestellte Versuche zeigten. So scheint mir die naheliegendste Erklärung zu sein, daß verschiedene *Phycomyces*-Stämme ein unterschiedliches Ausnützungsvermögen für Aneurin besitzen.

Als Ergebnis der besprochenen Punkte kann festgestellt werden, daß auch nach den Erfahrungen dieser Untersuchungen der *Schopfersche* Phycomycestest eine vorzügliche Methode zur quantitativen Bestimmung des Vitamin B₁-Gehaltes darstellt. Er ist an die verschiedensten Bedürfnisse anpassungsfähig und gibt, sofern nur die durch die Natur des Objektes gegebenen Fehlermöglichkeiten berücksichtigt werden, verlässliche Werte selbst bei niedrigstem Vitamingehalt. Er erfordert weniger Zeit als der Tiertest, kann mit viel weniger Material ausgeführt werden und übertrifft diesen sowie die chemischen Bestimmungsmethoden durch seine Empfindlichkeit. Etwa 50–100 mg der zu prüfenden Substanz genügen bereits für die quantitative Bestimmung. Vitaminmengen von 0,01% werden bereits sicher erfaßt, qualitativ sind noch geringere Mengen nachweisbar.

Zusammenfassung.

Es wird über Erfahrungen mit dem Phycomycestest berichtet, die bei der Prüfung des Aneurin gehaltes verschiedener *Grünalgen* gemacht wurden.

In einigen Punkten, vor allem bei der Trockengewichtsbestimmung und Aufstellung der Testkurven werden Abweichungen von der durch *Thren* mitgeteilten Arbeitsweise vorgeschlagen, durch die die Genauigkeit des Testes erhöht und die Ergebnisse noch befriedigender werden. Insbesondere wird die Verwendung einer ein für allemal aufgestellten Testkurve als Bezugsbasis für zu anderen Zeiten durchgeführte Versuche für bedenklich gehalten.

Weitere Hinweise für die Ausführung des Testes werden gegeben (Zusammensetzung der Nährlösung, Extrakterstellung und Auswertung der Erntegewichte).

Einige Beobachtungen über das Verhältnis zwischen gebotener Aneurinmenge und erzielter Pilzmasse werden besprochen.

Literatur.

- Harder, R.* und *H. v. Witsch*: 1942a Ber. d. Deutsch. Bot. Ges. **60** (146).
Dieselben: 1942b Forschungsdienst **16**, 270.
Lehnartz, E.: Einführung in die Chem. Physiologie, Berlin und Heidelberg, 1947.
Schopfer, W.H.: 1939 Erg. d. Biologie **16**, 1.
Derselbe: 1941 Vitamine und Hormone **1**, 463.
Schopfer, W.H. u. *A. Jung*: 1938 Zeitschrift f. Vitaminforsch. **7**, 143.
Stepp, W., Kühnau, J., Schroeder, H.: Die Vitamine und ihre klinische Anwendung, Stuttgart 1937.
Thren, R.: 1941 Vitamine und Hormone **1**, 100.
v. Witsch, H.: 1947 Nachr. d. Akad. d. Wiss. in Göttingen, Math.-Phys. Kl., Seite 9.
-

(Aus der Reichsforschungsanstalt für Lebensmittelfrischhaltung, Karlsruhe)

Die Sporenkeimung von *Aspergillus glaucus* in Abhängigkeit von Temperatur und relativer Luftfeuchtigkeit.

Von

Bernd Stille.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 14. Oktober 1947.)

Nach unseren heutigen Kenntnissen stellt *Aspergillus glaucus* unter allen Schimmelpilzen die geringsten Ansprüche an den Wassergehalt seiner Umgebung. So kann man z. B. bei der Lagerung der verschiedenartigsten wasserarmen Lebensmittel (wie Trockengemüse, Dörrobst, Dauergebäck, Dauerwurst usw.) immer wieder die Feststellung machen, daß — sobald mit zunehmender relativer Luftfeuchtigkeit ein bestimmter Grenzwert überschritten ist — *Aspergillus glaucus* bereits deutliche Kolonie- und Sporenbildung aufweist, während alle übrigen Mikroorganismenarten überhaupt noch nicht oder nur sehr geringfügig in Erscheinung treten. Wir sind somit berechtigt, *Aspergillus glaucus* als die Leitform unter den xerophilen Arten zu betrachten.

Eine zuverlässige Methode zur Ermittlung des Grenzwertes für die Sporenkeimung, das Wachstum und die Sporenbildung von Schimmelpilzen und Bakterien hat *Walter* (1924) bekanntgegeben: Es wird den Organismen stets ein geeignetes festes Substrat von gleicher Zusammensetzung geboten, während die relative Luftfeuchtigkeit (r. D. = rel. Dampfspannung) innerhalb der Versuchsgefäße durch Zugabe von Salzlösungen oder Säuren verschiedener Konzentration in der gewünschten Weise eingestellt wird.

In *Walter's* „Hydratur der Pflanze“ (1931) wird als äußerste Grenze für die Entwicklung von Schimmelpilzen eine r. D. von 85% angegeben. In späteren Untersuchungen, vor allem von *Tammes* (1937) u. *Heintzeler* (1939) konnte jedoch nachgewiesen werden, daß dieser Wert noch erheblich unterschritten wird. Es ist nämlich bei derartigen Versuchen unerlässlich, die Beobachtungsdauer auf genügend lange Zeiträume auszudehnen, denn in der Nähe des Grenzwertes tritt in manchen Fällen ein Auskeimen der Sporen erst nach mehreren Wochen oder Monaten ein.

Als Grenzwert für die Sporenkeimung von *Aspergillus glaucus* fand *Heintzeler* eine r. D. von 70.8%. In guter Übereinstimmung zu diesem Befund steht das Ergebnis einer späteren Untersuchung von *Stille* (1942), in der als äußerste Grenze für die Keimung 70% r. D. ermittelt wurde. Dieses absolute Hydraturminimum wird jedoch nur dann erreicht, wenn dem Pilz außer einem günstigen Nährboden gleichzeitig auch die für sein Gedeihen optimale Temperatur, die etwa 28–30° C beträgt, geboten wird. Sowohl bei höheren wie bei niedrigeren Temperaturen liegen die Grenzwerte für die Sporenkeimung stets bei einer höheren r. D.

Während die Versuche von *Heintzeler* an *Aspergillus glaucus* sich lediglich auf die Temperaturen von 20 und 30° erstrecken, soll in der vorliegenden Mitteilung ein größerer Temperaturbereich dargestellt und dabei insbesondere der Verlauf der Grenzwertverschiebung bis zum Temperaturmaximum, bei dem gerade noch ein Auskeimen der Sporen erfolgt, berücksichtigt werden.

Hinsichtlich methodischer Einzelheiten sei auf die ausführlichen Angaben von *Walter* (1924) verwiesen, und es soll hier nur kurz erwähnt werden, daß der für die Versuche verwendete Agarnährboden¹⁾ in kleineren Tropfen auf hohlgeschliffene Objektträger aufgetragen und verrieben wurde, um ihn darauf zunächst im Exsikkator zu einer dünnen Membran austrocknen zu lassen. Das in dieser Weise vorgetrocknete feste Substrat wurde alsdann kräftig mit Sporen von *Aspergillus glaucus* beimpft und darauf in die feuchten Kammern übertragen. Die gewünschten Abstufungen der r. D. wurden durch Calciumchloridlösungen verschiedener Dichte bewirkt; dabei wurden die Intervalle von Stufe zu Stufe, insbesondere bei den höheren CaCl_2 -Konzentrationen, möglichst eng gehalten (1%), um eine zuverlässige Ermittlung der Wachstumsgrenzen zu gewährleisten. Während der Versuchsdauer befanden sich die feuchten Kammern bei völlig konstanten Temperaturen im Thermostaten; damit war gleichzeitig jede vorübergehende Veränderung der r. D. innerhalb der Versuchsgefäße ausgeschlossen.

In Abb. 1 ist der Verlauf der Sporenkeimung von *Aspergillus glaucus* bei verschiedenen Temperaturen und relativen Luftfeuchtig-

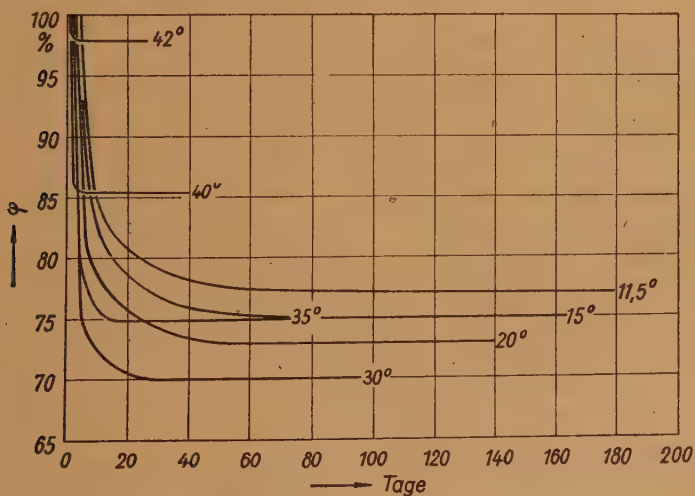


Abb. 1. Zeit bis zum Beginn der Sporenkeimung von *Aspergillus glaucus* abhängig von der relativen Luftfeuchtigkeit bei verschiedenen Temperaturen.

keiten wiedergegeben. Die sieben dargestellten Kurven zeigen den Beginn der Keimung bei 11,5°; 15°; 20°; 30°; 35°; 40° und 42° C; der

¹⁾ Zusammensetzung des Nährbodens: Glucose 100,0; Pepton-Witte 10,0; KH_2PO_4 2,0; MgSO_4 0,5; CaCl_2 0,1; Agar 16,0 g. Mit Leitungswasser auf 1 Liter aufgefüllt.

gesamte in die Untersuchung einbezogene Feuchtigkeitsbereich liegt zwischen 65 und 100% relativer Wasserdampfspannung.

Bei den hohen Feuchtigkeitswerten erfolgt stets ein rasches Auskeimen der Sporen, das durchweg mit steigender Temperatur beschleunigt wird. Sinkt jedoch die relative Luftfeuchte, so läßt sich bei Erreichen eines bestimmten, für jede Temperatur charakteristischen Feuchtigkeitswertes bald eine deutliche Verzögerung der Keimung feststellen, wie aus dem Übergang der Kurven aus dem vertikalen in den horizontalen Verlauf ersichtlich ist. Dieser Übergang in die Horizontale bedeutet nun, daß auch bei fortgesetzter Versuchsdauer ein Auskeimen unterhalb der jeweils erreichten Feuchtigkeitsgrenze nicht mehr eintreten kann.

Der niedrigste Grenzwert, 70% r. D., wird bei der für die Entwicklung des Pilzes optimalen Temperatur, um 30° C, erreicht; demgegenüber bewegen sich die Grenzwerte für sämtliche übrigen, höheren wie tieferen Temperaturen durchweg im Bereiche größerer relativer Luftfeuchtigkeit. Die Zeitdauer, die zum Erreichen des Grenzwertes erforderlich ist, verringert sich mit steigender Temperatur, wie die Tab. I veranschaulicht:

Tabelle I: Sporenkeimung von *Aspergillus glaucus*: Wechselbeziehungen zwischen Temperatur, Grenzwert d. r. D. und Zeit bis zur Erreichung des Grenzwertes

Temperatur:	11,5	15,0	20,0	30,0	35,0	40,0	42,5 Grad C.
Grenzwert (% r. D.):	77	75	73	70	75	85,5	98
Tage bis zum Erreichen des Grenzwertes:	110	78	60	26	16	6	2

Verfolgt man die Verschiebung der Grenzwerte, so ergibt sich eine typische Optimum-Kurve, wobei das Maximum dem Optimum sehr nahe liegt, während der zum Minimum strebende Schenkel der Kurve einen wesentlich flacheren Verlauf nimmt.

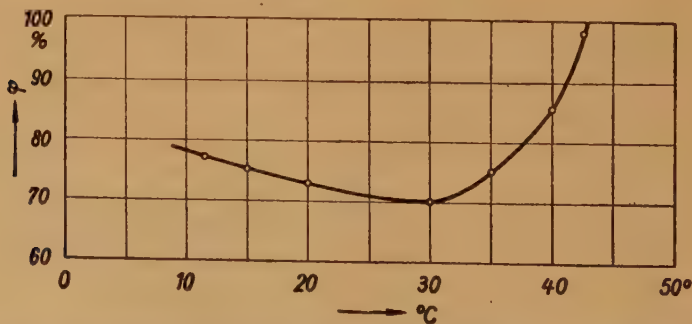


Abb. 2. Feuchtigkeitsgrenzwerte der Sporenkeimung abhängig von der Temperatur.

Im einzelnen ist der Temperaturbereich für die Entwicklung von *Aspergillus glaucus* durch folgende Kardinalpunkte gekennzeichnet:

Minimum -8° ; Optimum 30° ; Maximum 43° C.

Die Abstände der beiden Extreme vom Optimum betragen also 38 bzw. 13° C; sie verhalten sich somit zueinander annähernd wie $3:1$. Diese Proportion ist nun auch hinsichtlich der Verschiebung der Grenzwerte für die Keimung beiderseits des Temperaturoptimums verwirklicht; denn bei einer Überschreitung der optimalen Temperatur um n Grad C verringert sich der Feuchtigkeitsbereich, innerhalb dessen Sporenkeimung eintreten kann, um den gleichen Betrag, wie bei einer Unterschreitung des Temperaturoptimums um $3 \cdot n$ Grad C. So liegt z. B. die Keimungsgrenze sowohl für 15 wie für 35° C in beiden Fällen bei einer r. D. von 75% . Je weiter die Temperaturen sich nun vom Optimum entfernen, desto größer werden die Ansprüche, die der Pilz an den Wassergehalt seiner Umgebung stellt, so daß schließlich im Bereiche des Temperaturmaximums und des Temperaturminimums ein Auskeimen der Sporen nur dann noch erfolgt, wenn sie sich in völlig wasserdampfgesättigter Umgebung, also 100% iger r. D. befinden.

Es sollen nunmehr mit diesem an *Aspergillus glaucus* gewonnenen Befund die früheren Ergebnisse, die andere Autoren bei Untersuchungen verschiedener Schimmelpilzarten erzielten, verglichen und zu diesem Zweck die Arbeiten von Tomkins (1930), Tammes (1937) und Heintzeler (1939) herangezogen werden.

Tomkins, der die Entwicklung von *Alternaria citri* und *Trichoderma lignorum* unter verschiedenen Temperatur- und Feuchtigkeitsverhältnissen verfolgte, erkannte als Erster, daß die zum Eintritt der Sporenkeimung erforderliche Wasserdampfspannung im Bereiche optimaler Temperaturen den niedrigsten Wert aufweist. Diesen Befund konnten ähnliche Untersuchungen von Tammes an *Aspergillus Sydowi*

Tabelle II: Beziehungen zwischen Temperatur und Grenzwert der r. D. bei der Keimung verschiedener Pilze

Pilz	5°	10°	18°	20°	25°	30°	37°	40°	Autor
<i>Alternaria citri</i>	94,2	90,8	87,6	—	85,8	83,8	87,6	—	Tomkins
<i>Trichoderma lignorum</i>	—	95,6	92,6	—	90,8	94,2	95,6	—	Tomkins
<i>Aspergillus Sydowi</i> Sartory	—	—	—	85,0	—	77,0	—	85,0	Tammes
<i>Phycomyces nitens</i>	—	89,2	—	86,6	—	90,6	—	—	Heintzeler
<i>Aspergillus glaucus</i>	—	—	—	73,3	—	70,8	—	—	Heintzeler
<i>Oidium lactis</i>	—	92,6	—	90,0	—	91,8	—	—	Heintzeler

Sartory und von Heintzeler an *Phycomyces nitens*, *Aspergillus glaucus*, *Oidium lactis* u. a. bestätigen. Indessen wurde der Bereich unter- und überoptimaler Temperaturen von den genannten Autoren nur unzureichend untersucht, so daß die bisherigen Ermittlungen ein geschlossenes Bild über den tatsächlichen Verlauf der Grenzwertverschiebung in Abhängigkeit von der Temperatur nicht ermöglichen.

Die in Tab. II zusammengefaßten Ergebnisse zeigen, daß die erwähnten Autoren ihre Versuche bei keinem der untersuchten Organismen bis in den aufschlußreichen Bereich der Temperaturmaxima ausgedehnt haben. Berücksichtigt man ferner die Tatsache, daß wegen der beträchtlichen Temperaturintervalle in manchen Fällen das Temperaturoptimum und damit das Hydraturminimum der einzelnen Organismen nicht mit Sicherheit erfaßt wurde, und beachtet man schließlich noch, daß gelegentlich die Beobachtungsdauer im Bereiche unteroptimaler Temperaturen nicht auf die zum endgültigen Eintritt der Sporenkeimung erforderlichen Zeiten ausgedehnt wurde, so lassen sich auch diese Werte zur Ergänzung der eigenen an *Aspergillus glaucus* gewonnenen Befunde heranziehen. Diese lassen sich dahingehend zusammenfassen, daß die Ansprüche der Schimmelpilze an die Wasserdampfspannung ihrer Umgebung bei optimalen Temperaturen am niedrigsten sind, während sowohl im Bereiche des Temperaturmaximums als auch des Temperaturminimums eine annähernd 100%ige Wasserdampfsättigung zur Entwicklung erforderlich ist. Da das Temperaturmaximum dem Optimum durchweg wesentlich näher liegt als das Minimum dem Optimum, so ergibt sich die Tatsache, daß die Grenzwertverschiebung bei überoptimalen erheblich rascher verläuft als bei unteroptimalen Temperaturen.

Literatur.

- Heintzeler, I., Archiv f. Mikrobiologie **10**, 92 (1939).
Stille, B., Vorratspflege und Lebensmittelforschung **V**, 403 (1942).
Tammes, P. M. L., Recueil des trav. bot. néerl. **34**, 610 (1937).
Tomkins, R. G., Proc. Roy. Soc. London **105**, 375 (1930).
Walter, H., Zeitschr. f. Botanik **13**, 353 (1924).
Walter, H., Die Hydratur der Pflanze. G. Fischer, Jena (1931).

(Aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen)

Candida (Nectaromyces) Reukaufii als Fettbildner.

Von

August Rippel-Baldes, K. Pietschmann-Meyer und W. Köhler

(Eingegangen am 11. November 1947.)

Bei der weiten Verbreitung der Fette als Reservestoffe der heterotrophen Mikroorganismen hat man sich seit vielen Jahren auch mit der Frage beschäftigt, ob man die Fettbildung so gestalten könne, daß diese eine technische Ausbeutung gestatten würde; eine Literaturübersicht über diese Fragen gibt *Bernhauer*¹. Die Versuche scheiterten daran, daß man zwar gute Fettbildung erhielt, aber mit Mikroorganismen, namentlich *Fadenpilzen*, die als Oberflächenkulturen gezogen werden mußten, ein Verfahren, das für technische Zwecke unrentabel war. In Frage kam offenbar allein ein Lüftungsverfahren, analog dem Verfahren der *Preßhefe*- bzw. *Eiweißhefe*-Züchtung. Ein solches hat kürzlich *Damm*² mit *Fadenpilzen*, insbesondere *Fusarium*-Arten, bekanntgegeben.

Ich selbst hatte mir zum Ziele gesetzt, eine Hefe zu finden, die den geforderten Ansprüchen entspricht³. Das ist laboratoriumsmäßig geglückt, und zwar mit *Candida (Nectaromyces) Reukaufii* (Grüß) Diddens et Lodder. Biologisch ist bemerkenswert, daß dieser Organismus an seinem natürlichen Standort, den Blütennektarien, aus denen er zuerst von *Reukauf* isoliert wurde⁴, in keiner Weise eine Andeutung dieser Fähigkeit zur starken Fettbildung zeigt. Er findet sich dort als die bekannte Kreuzform (Aeroplanform; die Zahl der Wirtel kann mehr als 2 betragen), bildet in Bierwürze typische Hefe-Sproßverbände mit sehr geringen Fettmengen und unter geeigneten Bedingungen, die im folgenden erwähnt sind, Einzelzellen mit je einem großen Öltropfen.

¹ *K. Bernhauer*: *Ergebn. d. Enzymforschung* **9**, 297, 1943.

² *H. Damm*: *Chemiker-Zeitung* **67**, 47, 1943.

³ Diese Forderung wurde von *A. Rippel* aufgestellt bei einer Tagung des Forschungsdienstes in Berlin-Dahlem am 24. Februar 1940. Zuerst wurde über Ergebnisse in der Sitzung der Göttinger Akademie der Wissenschaften am 6. Februar 1942 berichtet (vergl. *Gött. Gel. Anz.* **204**, 94, 1942). Vorläufige Mitteilung: *Naturwissenschaften* **31**, 248, 1943. — Inzwischen hat sich auch *Nilsson* mit dieser Frage beschäftigt (*R. Nilsson, L. Enebo, H. Lundin und K. Myrbäck*: *Sv. Kem. Tidskr.* **55**, 41, 1943) und mit *Rhodotorula glutinis* gewisse Erfolge erzielt. Nach eigenen Erfahrungen bleibt diese Hefe, wie auch *Torulopsis pulcherrima* und andere geprüfte Hefen in Wachstumsfreudigkeit und Fettbildung (namentlich absolut!) weit hinter *Candida Reukaufii* zurück.

⁴ Zur Systematik vergleiche: *H. A. Diddens u. J. Lodder*: *Die anasko-sporogenen Hefen*. 2. Hälfte. Amsterdam 1942 (S. 283 ff.).

(Vgl. die Abb. 19 und 64, S. 34 und S. 88 bei *Rippel-Baldes*⁵). Die Hefe wurde als Einzell-Kultur von einer Würze-Agarplatte isoliert, über die eine Ameise gekrabbelt war; dann stellte sich die Identität mit der genannten Form heraus.

Die Versuche wurden in *Kluyverschen* Lüftungsgefäßen durchgeführt, meist mit 500 ccm Nährlösung in 1-Liter-Gefäßen. Diese wurden mit der Nährlösung $\frac{1}{2}$ Stunde im Autoklaven sterilisiert, nachdem die offenen Verbindungsstücke abgeklemmt bzw. mit einem Wattepfropfen versehen waren. Das Ansatzrohr wurde getrennt trocken sterilisiert, ebenfalls an den Enden mit Wattepfropfen versehen. Beim Aufbau der Apparatur wurden die mit verdünntem Alkohol befeuchteten Wattepfropfen herausgenommen und die Verbindung wurde mit in verdünntem Alkohol aufbewahrten Gummistücken hergestellt. Die unter Anschluß an die Wasserstrahlpumpe eingesogene Luft wurde durch ein mit Wattepfropfen versehenes trocken sterilisiertes Glasrohr filtriert. Geimpft wurde vorher meist mit einer Aufschwemmung von zwei auf Würzeschrägagar gezogenen Kulturen⁶ in 9 ccm sterilem Wasser; bei der dabei notwendigen Entfernung der durchbohrten Gummistopfen wurde der Stopfen und Gefäßrand durch Bestreichen mit verdünntem Alkohol sterilisiert. Die Apparatur blieb steril. Bei der normalen Lüftung wurden 70 ccm Luft je Minute = rund 100 Liter Luft je Tag durchgeleitet. Die günstigste Temperatur betrug um 25° C, bei der daher alle Versuche durchgeführt wurden.

Zur Verhütung des Schäumens, das sich leider sehr unangenehm bemerkbar machte, wurde Antispumin hinzugesetzt (Antispumin E flüssig der Firma Stockhausen [Velten]). Wie Analysen zeigten, wird der Fettgehalt der Hefe dadurch nicht beeinflusst⁷. Die Hefe wurde abzentrifugiert (je 50 ccm), einmal mit destilliertem Wasser aufgerührt, wieder abzentrifugiert, getrocknet und gewogen. Die Fettbestimmung erfolgte nach Salzsäure-Aufschluß (siehe die Methode bei *Geffers*⁸), die Zuckerbestimmung nach *Bertrand*, die Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl. Die Kulturdauer betrug meist zwei, bisweilen drei Tage. Als Grundsubstrat diente Holzzuckerwürze nach *Bergius* von den Bergin-Werken Mannheim-Rheinau, denen auch hier für die freundliche Überlassung bestens gedankt sei.

Maßgebend für die Beurteilung der Fettbildung waren die vom Verfasser⁹ angestellten Überlegungen, aus denen sich ergab, daß maximal ein Fett-Koeffizient von etwa 15 zu erwarten war (g Fett auf 100 g verarbeiteter Kohlenstoffquelle), wie sich auch experimentell bei Versuchen mit anderen Organismen bestätigte¹⁰. Es sei dabei ausdrücklich bemerkt, daß es für praktische Zwecke nicht so sehr auf einen hohen Prozentgehalt an Fett in der Trockenmasse ankommt wie auf

⁵ *A. Rippel-Baldes*: Grundriß der Mikrobiologie. Springer-Verlag, Berlin und Göttingen 1947.

⁶ Der Ertrag ist von der Stärke der Impfung ziemlich unabhängig; Impfung mit 1 Röhrchen hatte die gleiche Wirkung.

⁷ Das zugesetzte Entschäumungsmittel schwimmt nach dem Abzentrifugieren oben und wird durch das Abgießen entfernt. Durch Abwischen des Randes des Zentrifugenröhrchens kann auch der dort noch haftende Teil entfernt werden.

⁸ *H. Geffers*: Arch. f. Mikrobiologie 8, 66, 1937.

⁹ *A. Rippel*: Archiv f. Mikrobiologie 11, 271, 1940. Fettkoeffizient = g Fett auf 100 g verarbeiteten Zucker.

¹⁰ *H. Raaf*: Archiv f. Mikrobiologie. 12, 131, 1941.

die absolute Fettausbeute je Volumen Kulturflüssigkeit. Es ist, namentlich bei anderen Mikroorganismen, eine oft beobachtete Tatsache, daß zwar sehr hohe Fettprozentage erreicht werden können (40 bis 45%), die absolute Ausbeute an Fett aber gering ist. Ein Fettgehalt von etwa 25% ist, bei genügender absoluter Ausbeute, völlig genügend und oft absolut erfolgreicher, zumal dann auch mehr Zellmasse anfällt. Im folgenden ist jeweils die absolute Menge in g je 1 Liter Nährlösung besonders angegeben.

Noch auf eines sei hier aufmerksam gemacht. Es stellte sich heraus, daß das mikroskopische Bild, also die Größe des Öltropfens, durchaus kein Bewertungsmerkmal darstellt. Die Analyse zeigte oft höheren Fettgehalt bei kleineren Tropfen. Das Fett liegt offenbar nicht oder nicht immer in reiner Form vor, sondern offenbar emulgiert. Vielfach konnte beobachtet werden, daß kleinere Fettropfen, die analytisch eine höhere Fettausbeute ergaben, durch stärkere Lichtbrechung die offenbar stärkere Massierung des Fettes anzeigten. Auch die Intensität der Fett-Färbung (etwa mit Sudan) schien darauf hinzudeuten. Jedenfalls kann die mikroskopische Bewertung nur orientierend und bei genügender Übung herangezogen werden.

Es sollen nun einige Bedingungen geschildert werden, welche die Fettbildung beeinflussen, wobei allerdings zu bemerken ist, daß die Versuche nicht völlig so durchgeführt werden konnten wie es wünschenswert gewesen wäre, da einmal die verwendeten Lüftungsgefäße in Hinsicht auf die Lüftung nicht so einheitlich waren, vor allem nach längerem Gebrauch, wie das etwa bei Kolben mit ruhender Flüssigkeit der Fall gewesen wäre. Denn obwohl die Gefäße nach der Blasenzahl im Zufuhrschenkel auf annähernd gleiche Luftzufuhr geeicht waren, konnte doch kein Einfluß auf die Größe der durch die Siebplatten perlenden Bläschen gewonnen werden, ein Umstand, der sehr entscheidend sein kann. Andererseits machten sich andere zeitbedingte Schwierigkeiten bemerkbar, wie die Stärke des Wasserdrucks usw. Jedenfalls aber dürften die zu schildernden Ergebnisse gesichert sein, da sie bei zahlreichen Versuchen immer wieder gefunden wurden.

Wirkstoffe: Als zunächst bemerkenswert ist der hohe Wirkstoffbedarf des Organismus zu erwähnen. In reiner Holzzuckerwürze mit anorganischem Stickstoff und den üblichen sonstigen Nährsalzen erfolgt kaum Wachstum und Zuckerverbrauch. Zwar wird eine gewisse Ernte erzielt, aber deren Höhe bleibt gänzlich unsicher, da es sich zunächst um die aus der Nährlösung ausgefallten Phosphate usw. handelt. Man findet dann einen ökonomischen Koeffizienten¹¹ von 100 oder noch höher; die Hefeernte hatte in einem solchen Beispiel einen Aschegehalt von 51,4%. Solche Zahlen sind natürlich sinnlos. Zugabe von 0,5% Citronensäure vor dem Abzentrifugieren der Hefe löst zwar den größten Teil des Niederschlags, bessert aber nicht völlig. Bei normalem Wachstum wird dagegen der Niederschlag durch die Hefe aufgelöst.

Tabelle I zeigt die Wirkung eines Extraktes von *Candida Reukaufii* selbst und von *Preßhefe*. In der *Preßhefe* sind also, wie die bessere Wirkung zeigt, erheblich mehr Wirkstoffe als in der *Fetthefer*; die Trockensubstanz beträgt bei gleicher Menge Ausgangshefe bei der *Preßhefe* das 4,5-fache; auch der prozentige Fettgehalt ist gestiegen.

¹¹ g Trockensubstanz je 100 g verarbeiteten Zucker.

der Fett-Koeffizient auf das 3,5-fache, ähnlich der ökonomische Koeffizient. Die absolute Fettausbeute je Liter stieg infolge Summierung der günstigen Teilvorgänge auf das 5-fache an.

Tabelle I. Wirkung verschiedener Hefeextrakte

	Zusatz von Extrakt von g trockener Hefe		
	<i>Candida Rouxii</i> 6,35 g	9,87 g	<i>Presshefe</i> 8,06 g je Gefäß
g Zucker vorher in 100 ccm	5,24	5,18	5,31
g Zucker verbraucht	2,44	2,77	3,58
Fett in %	8,55	7,88	9,25
Eiweiß in %	28,00	24,81	11,25
Fett-Koeffizient	0,97	1,04	3,65
Eiweiß-Koeffizient	3,18	3,26	4,44
Ökonomischer Koeffizient	11,4	13,1	39,4
Je 1 Liter/g			
Trockensubstanz	2,77	3,64	14,12
Fett	0,24	0,29	1,31
Eiweiß	0,78	0,90	1,59

Nährlösung: Holzzucker, 0,2% K_2HPO_4 , 0,2% K_2SO_4 , 0,05% $MgSO_4$, 0,005% $FeSO_4$, 0,05% $(NH_4)_2HPO_4$. pH 6,8. 500 ccm in 1000 er Kluverkolben. Impfung mit 2 Würzeagar-Schrägröhrchen (Hefe mit 9 ccm dest. Wasser aufgeschwemmt). Hefe mit mehreren hundert ccm Wasser $\frac{3}{4}$ Stunden im Wasserbad digeriert, abfiltriert, Filtrat verwendet. Lüftung 2 Tage.

Demgegenüber verhält sich die Eiweißbildung ganz anders: Der Prozentgehalt an Eiweiß betrug umgekehrt bei der *Fetthefer* etwa das 2,5-fache des Wertes der *Preßhefer* trotz höherer absoluter Eiweißbildung bei dieser im Liter. Das zeigt einmal, daß die schlechte Entwicklung auf *Candida*-Extrakt nicht durch Stickstoffmangel allein verursacht werden konnte. Zum andern tritt hier die allgemein gültige Erscheinung auf, daß Eiweiß- und Fettbildung bis zu einem gewissen Grade getrennt voneinander verlaufen. Das gilt also nicht nur für eine verschieden hohe Ernährung mit Stickstoff, auf die noch zurückzukommen sein wird, sondern offenbar allgemein für alle Verhältnisse, die aus irgendeinem Grunde zwar noch eine gewisse Eiweißbildung zulassen, aber keine stärkere Fettbildung, wobei der Mechanismus dieser Vorgänge einstweilen ungeklärt bleibt. Jedenfalls kann vorläufig nicht von einer spezifischen Wirkung von Wirkstoffen und dergleichen gesprochen werden, da der Grad der Lüftung die gleichen Zusammenhänge zeigt, wie noch zu sagen sein wird. Es handelt sich also um eine allgemeine Beeinflussung des Stoffwechsels, der so vor sich geht, daß zunächst eine Vermehrung der Zellen mit entsprechender Eiweißbildung erfolgt, an die sich, falls die Verhältnisse günstig sind, die Verfettung anschließt. Äußerlich macht sich das dadurch bemerkbar,

daß die Sproßzellen, die zunächst entstehen (Größe $3-5 \times 8-11 \mu$) sich etwas abrunden, stark vergrößern und zu Fettzellen werden (Größe $8-11 \times 11-14 \mu$). Daß damit der Eiweißgehalt der Zelle, offenbar bei Sistierung der Eiweißbildung, sinkt, ist klar.

Das in Tabelle II wiedergegebene Beispiel möge das Gesagte noch weiter erläutern. Es handelt sich einmal um den immer benutzten Stamm, sodann um einen weiteren, von diesem durch weitere Einzell-

Tabelle II. Zellvermehrung, Fett- und Eiweißbildung

	Normalstamm	abgezwiegtter Stamm
pH-Wert vorher	6,8	6,8
pH-Wert nachher	4,5	4,5
g Zucker vorher in 100 ccm.	5,4	5,4
g Zucker verbraucht in 100 ccm	3,84	4,39
Fett in %	11,27	18,22
Eiweiß in %	24,76	14,94
Fett-Koeffizient	1,79	4,48
Eiweiß-Koeffizient	3,92	3,92
Ökonomischer Koeffizient	15,85	26,21
Je 1 Liter/g		
Trockensubstanz	6,10	11,52
Fett	0,69	2,10
Eiweiß	1,51	1,72
Relative Zellenzahl	100	88,7

Nährlösung: Holzzuckerwürze, 0,1% $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$, 2% Kleieextrakt (Herstellung siehe Tab. III und IV.); sonst wie in Tabelle I.

Kultur abgezweigten, der also als mit jenem identisch angesprochen werden könnte. Im übrigen ist das in diesem Zusammenhange belanglos. Wichtig ist, daß der neue Stamm bei gleicher äußerer Behandlung von dem alten in der gleichen Weise abweicht, wie es in Tabelle I bei der besseren Ernährung mit *Preßhefe* der Fall ist. Trotz etwa doppelt so hoher Trockensubstanz hatte die Kultur aber, wie durch Auszählung gefunden wurde, nur 88,7% der Zellen des Normalstammes; die Zellen hatten geringeren Prozentgehalt an Eiweiß, aber höheren an Fett. Der Normalstamm war also über die Stufe der anfänglichen Zellvermehrung und Eiweißbildung erheblich weniger fortgeschritten.

Was die Wirkstoffe betrifft, so scheint es sich in erster Linie um Biotin zu handeln. Leider war es nicht möglich, diesen Stoff zu beschaffen; doch stellte Herr Dr. Moeller (Heidelberg) liebenswürdigerweise einen Versuch an, der die hauptsächliche Wirkung von Biotin ergab; daneben werden in schwächerem Maße noch andere Wirkstoffe in Frage kommen. Aneurin allein (0,5 mg auf 500 ccm Nährlösung) war bei einem eigenen Versuch völlig wirkungslos.

Candida Reukaufii kann infolgedessen nur in Nährlösungen gezogen werden, die genügend dieser Wirkstoffe enthalten. In dieser Hin-

sicht mußten wir auf Naturstoffe zurückgreifen und fanden Extrakte der verschiedenartigsten Pflanzen und Pflanzenteile wirksam, ferner Molke, die indessen allein nicht verwertbar ist, offenbar weil die Lactose nicht verarbeitet wird. Tabelle III zeigt einen solchen Versuch. Der Tabelle I gegenüber tritt die Überlegenheit dieser Extrakte namentlich in Hinsicht auf die Höhe des Fett-Koeffizienten, der absoluten Fettausbeute und teilweise auch des ökonomischen Koeffizienten deutlich hervor. Umgekehrt ist der Eiweiß-Koeffizient¹² sehr niedrig, und hier, wie bei zahllosen weiteren Versuchen, zeigt sich die allgemeine Erscheinung, daß, je höher der Fett-Koeffizient ist, um so geringer der Eiweiß-Koeffizient wird und umgekehrt. Gleichheit der beiden Koeffizienten wurde bei einem jeweiligen Wert von etwa 3 bis zu einem solchen von etwa 8 gefunden. Ein Zusammenhang mit der Höhe der Prozentgehalte oder der Trockensubstanzbildung konnte in Hunderten von Versuchen nicht festgestellt werden.

Daß in dem Versuch der Tabelle III dem Stickstoffgehalt der Extrakte die entscheidende Bedeutung bei der Fettbildung nicht zukommt, zeigt der Vergleich von *Trifolium repens* mit *Arrhenaterum elatius*: annähernd gleicher Stickstoffgehalt, aber Fett-Koeffizienten von 8,3 bzw. 14. Deutlich zeigt sich aber, daß junge Pflanzenteile höheren Wirkstoffgehalt für die Fettbildung besitzen als ältere. Wenn auch die Zahlen bei den vier Pflanzen nicht so gleich sind, daß sie völlig mit-

Tabelle III. Wirkung verschiedener Pflanzenextrakte

	Extrakt von			
	Weizenstroh	<i>Arrhenaterum elatius</i>	Junges Gras	<i>Trifolium repens</i>
g Zucker vorher in 100 cem	4,77	4,77	4,91	5,07
g Zucker verbraucht	2,13	4,15	4,36	4,03
Fett in %	22,85	32,38	25,46	22,89
Eiweiß in %	8,38	5,19	7,00	8,25
Fett-Koeffizient	10,06	13,99	9,92	8,32
Eiweiß-Koeffizient	3,69	2,24	2,73	3,00
Ökonomischer Koeffizient	44,02	43,22	38,95	36,95
Je 1 Liter/g				
Trockensubstanz	9,38	17,93	16,98	14,65
Fett	2,14	5,81	4,32	3,35
Eiweiß	0,79	0,93	1,19	1,21
mg N im Extrakt je Kultur	34,54	55,5	57,83	60,40
Extrakt aus g	25,70	18,50	12,25	5,00

Nährlösung: Wie in Tabelle I, aber 0,05% $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$. Zur Herstellung der Extrakte wurde das fein gemahlene Pflanzenmaterial zur Entfernung der Luft wiederholt evakuiert, sodann 2 Stunden im Dampfbad erhitzt, abfiltriert, das Filtrat verwendet.

¹² g Eiweiß auf 100 g verarbeiteten Zucker (A. Rippel und K. Nabel: Archiv f. Mikrobiologie. 10, 359, 1939).

einander verglichen werden können, so ergibt sich doch die eindeutige Reihe: *Trifolium* > junges *Gras* > *Arrhenaterum* (in Halmbildung!) > Stroh.

Bei den zahlreichen Versuchen, die wir durchführten, wurden im allgemeinen Molke, Weizenkleie, Weizenkeime und Luzerne (ganze Pflanzen) als Wirkstofflieferanten benutzt. Es hat keinen Zweck, auf alle diese Versuche einzugehen, zumal jeweils Beschaffenheit und Wirkung des Materials natürlich außerordentlich wechseln, auch bei der gleichen Pflanzenart. So sei in Tabelle IV nur noch die Wirkung steigender Gaben von Molke gezefft, die, wie man sieht, alle geschilderten Erscheinungen wiederholen. Es sei nur darauf aufmerksam ge-

Tabelle IV. Wirkung steigender Gaben von Molke

Molke	0	2,5%	5%	10%
pH-Wert vorher	6,8	6,8	6,8	6,8
pH-Wert nachher	5,0	5,0	—	5,3
g Zucker vorher in 100 ccm	1,97	1,97	2,05	2,28
g Zucker verbraucht	1,59	1,55	1,72	1,87
Fett in %	17,20	18,96	20,20	24,71
Eiweiß in %	17,22	13,25	10,89	9,63
Fett-Koeffizient	3,91	6,03	8,83	13,76
Eiweiß-Koeffizient	3,91	4,22	4,76	5,36
Ökonomischer Koeffizient	22,71	31,82	43,7	55,7
Je 1 Liter/g				
Trockensubstanz	3,60	4,94	7,53	10,42
Fett	0,62	0,94	1,52	2,57
Eiweiß	0,62	0,65	0,82	1,05

Nährlösung: Wie in Tabelle I, aber 0,0124% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. 1% Weizenkleie-Extrakt, d. h. Extrakt von so viel Kleie, daß auf 100 ccm Nährlösung der Extrakt von 1 g Kleie entfällt. So auch bei den übrigen Tabellen.

macht, daß trotz Sinkens des Prozentgehaltes an Eiweiß und des Eiweiß-Koeffizienten nach höheren Gaben von Molke die absolute Ausbeute an Eiweiß (g je Liter) steigt wegen der stärkeren Zellvermehrung. Die intrazellularen Stoffwechselvorgänge können also davon unabhängig verlaufen. Charakteristisch ist auch die bei steigenden Gaben von Molke immer bessere ökonomischere Arbeit des Organismus: Von 0 bis 10% Molke ergibt sich ein Mehrverbrauch an Zucker je Liter von 2,80 g, eine Erhöhung der Trockensubstanz dagegen von 6,82 g und des Fettes von 1,95 g, welcher Wert energetisch 4,88 g Zucker entsprechen würde. Das kommt ja auch in der Erhöhung des ökonomischen Koeffizienten zum Ausdruck. Allerdings leiden die Versuche darunter, daß es sich bei den Zusätzen um komplexe Substanzen handelt, von denen man nicht weiß, wieviel von ihnen selbst mit in den Stoffwechsel gezogen werden (von Wirkstoffen abgesehen). Indessen die Tatsache,

daß wir mit steigenden Gaben von Molke die Steigerung der Fettbildung sehen, bei steigenden Gaben von Ammonphosphat (Tabelle VI) dagegen ein Sinken, während in beiden Fällen Eiweiß-Koeffizient und absolute Eiweiß-Ausbeute steigen, zeigt, daß es sich in beiden Fällen nur um den von den übrigen Stoffwechselvorgängen mehr oder weniger unabhängigen Vorgang der Fettbildung selbst handeln kann.

In Tabelle V sind weiter einige Versuche mitgeteilt, die besonders hohe Fettausbeuten zeigen. Erstaunlich ist hierbei, daß innerhalb von zwei Tagen solche Werte erreicht werden können, wobei noch zu be-

Tabelle V. Beispiele besonders guter Fettausbeuten

Nährlösung	Holzzucker mit 2% Luzerne- extrakt	Holzzucker mit 2,5% Kleieextrakt und Molke	
		10%	25%
g Zucker vorher in 100 ccm	5,28	5,40	9,32
g Zucker verbraucht	4,69	4,34	7,46
Fett in %	37,54	34,15	28,30
Eiweiß in %	5,81	11,30	9,22
Fett-Koeffizient	16,40	15,16	10,05
Eiweiß-Koeffizient	2,54	5,04	3,27
Ökonomischer Koeffizient	43,71	44,4	35,5
Je 1 Liter/g			
Trockensubstanz	20,50	19,28	26,49
Fett	7,70	6,58	7,94
Eiweiß	1,19	2,19	2,44

Nährlösung: wie in Tabelle I, bei Luzerneextrakt ohne, bei den beiden anderen mit 0,093% $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$. Lüftung bei Luzerneextrakt 2 Tage, bei Molke 10% 3 Tage, bei Molke 25% 4 Tage.

achten ist, daß die Impfmenge absolut sehr gering ist: Die beiden zur Impfung verwendeten Schrägröhrchen haben eine Trockenmasse an Hefe von nur 50 mg, so daß im Falle des *Luzerne*-Extraktes das 205-fache der Impfmenge an Ertrag erzielt wurde.

Dieser Fall blieb nicht etwa vereinzelt, sondern solche Werte wurden sehr oft erreicht; auch der hohe Fett-Koeffizient von etwas über 15 wurde mehrfach gefunden, bewegte sich aber meist etwas darunter. Jedenfalls kann bei einigermaßen normalem Wachstum mit einem Fett-Koeffizienten von 10 ohne weiteres gerechnet werden. Auffallend ist noch der abnorm niedrige Eiweißgehalt von 5,81% (Eiweiß-Koeffizient 2,54). Es mag hier erwähnt werden, daß der Eiweißgehalt durch Multiplikation des Gesamt-Stickstoffs mit 6,25 ermittelt wurde; wie Versuche zeigten, liegt praktisch der gesamte Stickstoff als Eiweiß vor.

Erstaunlich ist auch die hohe Dichte, die von der Hefe mit 26,5 g Trockensubstanz im Liter erreicht werden kann; doch wurde das Maximum nicht festgestellt. Die Grenze der Fettausbeute liegt bei einem

Fett-Koeffizienten von rund 15, gelegentlich wenig darüber; im Maximum fanden wir den Wert 17,5. Diese Feststellung deckt sich also mit dem von dem einen von uns durch theoretische Überlegungen angegebenen Grenzwert von etwa 15, der, wie oben erwähnt, auch von anderen Autoren ermittelt wurde.

Stickstoffernährung. Tabelle VI zeigt als Beispiel die Wirkung steigender Ernährung mit Ammonphosphat bei Zusatz von 3% Weizenkleie-Extrakt. Man sieht, daß zwar die Trockensubstanzbildung nach den höheren Gaben steigt, ebenso der Prozentgehalt an

Tabelle VI. Stickstoffernährung und Fettbildung

Differenzierung	% Ammonphosphat			
	0	0,025	0,05	0,10
pH-Wert vorher	6,8	6,8	6,8	6,8
pH-Wert nachher	6,3	6,3	5,9	5,2
g Zucker vorher in 100 cem	5,21	5,21	5,21	5,21
g Zucker verbraucht	3,26	4,39	4,88	4,91
Fett in %	30,70	21,35	17,06	11,03
Eiweiß in %	6,25	5,91	6,63	10,81
Fett-Koeffizient	13,14	8,85	7,75	4,87
Eiweiß-Koeffizient	2,67	2,45	3,01	4,71
Ökonomischer Koeffizient	42,8	41,5	45,5	44,1
Je 1 Liter/g				
Trockensubstanz	13,95	18,20	22,18	21,67
Fett	4,28	3,89	3,78	2,39
Eiweiß	0,87	1,08	1,47	2,34

Nährlösung: Wie in Tabelle I. 3% Weizenkleieextrakt. Lüftung
3 Tage.

Eiweiß, der Eiweiß-Koeffizient und die absolute Eiweißausbeute, offenbar als Maßstab einer intensiven Zellvermehrung. Aber die Fettbildung sinkt sehr stark ab, der prozentige Fettgehalt von 30,7 auf 11,05%, der Fettkoeffizient von 13,14 auf 4,87%. Dieses Sinken ist so stark, daß es mit der Erhöhung der Trockensubstanzbildung nicht Schritt halten kann, so daß die absolute Fettausbeute von 4,25 auf 2,39 g im Liter sinkt. Der Gegensatz Eiweiß-Fett-Stoffwechsel tritt hier also besonders schön in Erscheinung. Steiner hat bereits für *Endomyces ver-nalis* auf diese Zusammenhänge hingewiesen¹³.

Es sei jedoch noch darauf aufmerksam gemacht, daß u. U. bei geringen Stickstoffgaben Unregelmäßigkeiten auftreten, so auch in Tab. VI, wo bei 0,025% Ammonphosphat der Eiweißgehalt und Eiweiß-Koeffizient niedriger sind als bei der 0-Gabe. Ähnliches konnte in einigen anderen Fällen beobachtet werden, auch Fettgehalt und Fett-Koeffizient konnten,

¹³ M. Steiner: Ber. Deutsch. Botan. Ges. 56, 73, 1938; S. Heide: Archiv f. Mikrobiologie. 10, 135, 1939.

u. U. nur der Fett-Koeffizient, etwas erhöht sein. Möglicherweise ist die in dieser Spanne besonders große Ertragssteigerung die Ursache, falls nicht unkontrollierbare technische Unregelmäßigkeiten verantwortlich zu machen sind. Daß die Abweichungen stets bei sehr geringer Stickstoffgabe auftreten, ist an sich noch nicht beweisend, da sich Unregelmäßigkeiten am ehesten da bemerkbar machen müssen, wo die Verhältnisse noch nicht zu extrem sind.

Lüftung: Die Lüftung ist ein sehr wesentlicher Faktor, wie der in Tabelle VII wiedergegebene Versuch zeigt. Man sieht, wie hier alle oben geschilderten Begleiterscheinungen erhöhter Fettbildung mit ihrem Gegensatz zur Eiweißbildung (nur der Eiweißkoeffizient steigt etwas mit steigender Lüftung infolge der starken Erhöhung der

Tabelle VII. Wirkung der Lüftung

	Lüftung			
	Sehr schwach	Schwach	Stärker	Stark
pH-Wert vorher	6,8	6,8	6,8	6,8
pH-Wert nachher	4,3	4,6	4,6	4,6
g Zucker vorher in 100 cem	1,90	1,90	1,90	1,90
g Zucker verbraucht	1,25	1,50	1,70	1,73
Fett in %	12,84	15,27	15,42	16,69
Eiweiß in %	30,59	32,59	23,69	21,88
Fett-Koeffizient	2,76	4,06	5,58	6,80
Eiweiß-Koeffizient	6,56	8,69	8,58	8,91
Ökonomischer Koeffizient	21,5	26,6	36,2	40,7
Je 1 Liter/g				
Trockensubstanz	2,67	3,98	6,16	7,06
Fett	0,34	0,51	0,95	1,18
Eiweiß	0,82	1,30	1,46	1,54

Nährlösung: Holzzuckerwürze, 1% Malzkeimextrakt, 0,075% NH_4NO_3 , sonst wie in Tabelle I. 3 Tage Kulturdauer.

Trockensubstanzbildung) lediglich als Funktion der Lüftung erscheinen. Demnach ist kein bestimmter Stoff unmittelbar entscheidend für die Fettbildung, sondern nur die Möglichkeit, den Mechanismus der Fettbildung infolge kräftiger Sauerstoffzufuhr reibungslos ablaufen zu lassen, selbstverständlich aber auf bestimmter stofflicher Grundlage. Energetisch ist die Wirkung der Lüftung ohne weiteres verständlich, da die im Vergleich zum Zucker erhöhte potentielle Energie des Fettes eine Energiezufuhr verlangt, die nur durch eine kräftige Sauerstoffzufuhr gedeckt werden kann.

Eigentlich ist, daß die Hefe in dem tollsten Strudel der stärksten Lüftung die besten Bedingungen für die Fettbildung zeigt, was deshalb noch hervorgehoben sei, weil man in alten Angaben die Meinung lesen kann, der Organismus brauche Ruhe zur Verfettung.

Konzentration der Wasserstoffionen. Wie die Angaben in Tabelle IV und VI zeigen, steigt während der Kultur die Kon-

zentration der Wasserstoffionen. Der dort angegebene Höchstwert von p_H 5,2 kann noch unterschritten werden; gelegentlich bis 3,4, allgemeiner nur bis etwa 4,5. Der letztgenannte Wert ist auch etwa der Grenzwert, bis zu dem die Anfangskonzentration der Wasserstoffionen ohne wesentliche Schädigung vertragen werden kann, wie Tabelle VIII zeigt. Im Vergleich zum Anfangswert 6,8 ist der Stoffwechsel bei 5,5 völlig unverändert, während 4,5 schon eine kleine Veränderung in der Richtung zeigt, daß der Fettgehalt und der Fett-Koeffizient annähernd

Tabelle VIII. Wirkung der Anfangskonzentration der Wasserstoffionen

	p_H -Wert zu Versuchbeginn					
	6,8	5,5	6,8	4,5	5,0	4,0
p_H -Wert nachher	4,2	3,8	—	—	3,4	3,5
g Zucker vorher in 100 ccm	1,97	1,97	1,79	1,79	5,08	5,08
g Zucker verbraucht	1,79	1,81	1,25	0,90	4,07	0,96
Fett in %	14,68	15,10	32,45	28,97	10,11	10,17
Eiweiß in %	21,70	19,89	10,82	18,25	22,57	40,63
Fett-Koeffizient	4,57	4,80	15,74	13,53	3,52	4,97
Eiweiß-Koeffizient	6,75	6,32	5,24	8,52	7,86	19,85
Ökonomischer Koeffizient	31,1	31,8	48,5	46,7	34,8	48,9
Je 1 Liter/g						
Trockensubstanz	5,57	5,75	6,06	4,16	14,17	4,69
Fett	0,82	0,87	1,97	1,21	1,43	0,47
Eiweiß	1,21	1,14	0,66	0,76	3,20	1,91

Nährlösung: In Versuch I 2% Weizenkleie-Extrakt, 0,075% NH_4NO_3 , sonst wie in Tabelle I. Versuch II 1% Weizenkleie-Extrakt, 10% Molke, 0,0124% $(NH_4)_2HPO_4$, sonst wie vorher. Versuch III 3% Weizenkleie-Extrakt, 0,2% $(NH_4)_2HPO_4$; 3 Tage Kulturdauer.

unverändert geblieben sind, während der Eiweißgehalt und Eiweiß-Koeffizient stark anstiegen, die Trockensubstanzbildung stark zurückging, Erscheinungen, die sich von 5,0 zu 4,0 noch weit ausgeprägter zeigen. Im letzten Falle fällt der hohe ökonomische Koeffizient bei geringem Zuckerverbrauch auf. Ähnliches ergab sich bei weiteren Versuchen. Man sieht also, daß an sich die Möglichkeit zu einer ökonomischen Ausnutzung des Zuckers gegeben ist, daß diese aber offenbar stärker auf die Eiweißbildung als auf die Fettbildung gelenkt wird bei allgemeiner Hemmung des Wachstums.

Zur Ergänzung wurde ein Versuch durchgeführt, in dem, bei gleichem Ausgangs- p_H von 6,8 die eine Kultur unverändert belassen wurde und ein End- p_H von 4,3 zeigte, während eine andere nach 6½ Stunden Lüftung von p_H 6,0 auf 6,7 nach 24 Stunden von 4,8 auf 5,6, nach 32 Stunden von 5,0 auf 5,8 gebracht wurde; das End- p_H nach 48 Stunden betrug 5,0. Die Analysen ergaben für beide Kulturen völlig gleiche Werte für Fett, Eiweiß, Trockensubstanz und Zuckerverbrauch.

Man kann also sagen, daß das normale Wachstum bei einem Ausgangs- pH -Wert von 6,8 durch die im Stoffwechsel gebildeten verhältnismäßig geringe Säuremenge nicht gehemmt wird, daß aber ein Ausgangswert von unter 5,0 zu einer Verminderung der Trockensubstanzbildung führt. Auf weitere Einzelheiten wird gleich zurückzukommen sein. Erwähnt möge noch werden, daß im Verlaufe der Entwicklung u. U. auch wieder eine geringfügige Erhöhung des pH -Wertes eintreten kann, wie Beispiel 3 in Tabelle IX zeigt.

Zeitlicher Verlauf: In Nährlösungen mit 5% Zucker ist die Fettbildung nach 48 Stunden, günstige Entwicklungsverhältnisse vorausgesetzt, nahezu abgeschlossen. Bei den hohen Ausbeuten, wie sie oben in Tabelle V (*Luzerne-Extrakt*) erwähnt wurden, vollzieht sich

Tabelle IX. Zeitlicher Verlauf der Fett- usw. Bildung

Versuch Nr.	pH -Wert vorher	pH -Wert nachher	g Zucker vorher in 100 ccm	g Zucker verbraucht	Fett in %	Eiweiß in %	Fett-Koeffizient	Eiweiß-Koeffizient	ökonomischer Koeffizient	Je 1 Liter g Trocken- substanz	Fett	Eiweiß
1)												
1	6,8	4,8	8,36	2,81	2,74	34,44	0,56	7,08	20,6	5,79	0,16	1,99
2	6,8	4,8	8,36	4,36	9,95	23,63	1,90	4,51	19,1	8,33	0,83	1,97
3	6,8	4,8	8,36	6,22	11,25	19,88	1,86	3,29	16,5	10,28	1,16	2,04
4	6,8	4,4	8,36	6,65	9,44*)	17,31	1,52	2,79	16,1	10,72	1,02	1,86
2)												
2	6,8	4,4	5,25	2,97	7,09	26,44	1,36	5,08	19,2	5,72	0,41	1,51
3	6,8	4,9	5,25	3,97	8,96	16,50	2,07	3,81	23,1	9,16	0,82	1,51
4	6,8	5,1	5,25	4,52	9,37	11,00	2,84	3,33	30,3	13,68	1,28	1,50
5	6,8	4,9	5,25	4,81	11,21	10,69	3,48	3,32	31,0	14,92	1,67	1,59
6	6,8	4,9	5,25	4,86	10,45	10,06	3,40	3,27	32,5	15,80	1,65	1,59
7	6,8	5,1	5,25	4,84	10,30	10,50	3,59	3,66	34,9	16,85	1,74	1,80
3)												
2	6,8	4,3	5,25	2,35	12,75	19,44	3,33	5,08	26,1	6,14	0,78	1,19
3	6,8	4,3	5,25	2,76	15,13	20,50	3,59	4,86	23,7	6,55	0,99	1,34
4	6,8	4,4	5,25	2,79	14,33	19,06	3,32	4,42	23,2	6,46	0,93	1,23
5	6,8	4,4	5,25	2,89	14,45	18,75	3,23	4,19	22,4	6,47	0,93	1,21
6	6,8	4,4	5,25	3,03	13,92	16,69	3,00	3,60	21,5	6,53	0,91	1,09
7	6,8	4,4	5,25	2,89	14,99	15,81	3,39	3,38	22,6	6,54	0,98	1,03

*) Wert wahrscheinlich zu niedrig, da Oefäß stark schäumte und etwas Flüssigkeit überging.

Nährlösung: Wie in Tabelle I, aber ohne K_2SO_4 ; im übrigen bei 1) 3% Weizenkleie-Extrakt, 0,125% $(NH_4)_2HPO_4$. Bei 2) und 3) 2% Weizenkleie-Extrakt, 0,10% $(NH_4)_2HPO_4$. 2000 ccm in 2-Liter Gefäßen.

also die Fettbildung in einem Zuge, unmittelbar an die Eiweißbildung (= Zellvermehrung) anschließend. Es fragt sich somit nur, ob bei schlechterer Fettbildung die Zeit der Lüftung einen gewissen Ersatz

bilden könne, was aber, wie Tabelle IX zeigt, nicht der Fall ist. Das erste Beispiel, in dem vier verschiedene Kolben benutzt wurden, zeigt, daß 24 Stunden für die Fettbildung nicht ausreichen, wohl aber für die Eiweißbildung, die dann schon völlig abgeschlossen ist; man beachte die absoluten Zahlen des gebildeten Eiweiß (g je Liter). Bis zum 3. Tage tritt nur mehr eine geringfügige Steigerung ein. Das 2. Beispiel, in dem aus einem großen Kolben jeweils Proben zur Untersuchung entnommen wurden, zeigt das gleiche, nach dem 3. Tage ist die Steigerung der Fettbildung nur mehr unwesentlich; der Zucker wurde fast völlig verbraucht. In dem dritten Beispiel endlich tritt nach dem 3. Tage keinerlei Steigerung der Fettbildung mehr ein, bei völliger Sistierung des Zuckerverbrauches etwas unter der Hälfte der ursprünglich gebotenen. Nur bei sehr hoher Zuckerkonzentration (vgl. Tabelle X) verschiebt sich die Fettbildung zeitlich etwas.

Es kann also gesagt werden, daß die Fettbildung sich entweder sofort an die Eiweißbildung anschließt oder überhaupt nicht in größerem Umfange in Gang kommt, wenn offenbar irgendwelche Faktoren ungeeignet sind (man vergleiche jedoch den nächsten Abschnitt über die Wirkung hoher Zuckerkonzentration). Im Falle des Versuchs 1) dürfte die Stickstoffernährung zu hoch, im Falle von Versuch 2) und 3) die Lüftung der großen Gefäße nicht ausreichend gewesen sein. Daß der pH -Wert dabei nicht entscheidend war, dürfte nach den in Tabelle VIII mitgeteilten Ergebnissen anzunehmen sein. Weiterhin spricht dafür, daß in Versuch 2) gegenüber Versuch 3) die Fettbildung gerade bei etwas niedrigeren pH -Werten besser ist. Man wird nach allem annehmen können, daß die Änderungen des pH -Wertes lediglich eine Begleiterscheinung, nicht die Ursache des Ganges der Fettbildung sind.

Sonstige Beobachtungen. Auf die Wirkung der Zuckerkonzentration einzugehen, erscheint zwecklos, da ja lediglich das Verhältnis zu den übrigen Ernährungsfaktoren dadurch geändert wird, also gegenüber den obigen Ausführungen keine neuen Ergebnisse zu erwarten sind. Nur eine Erscheinung ist noch bemerkenswert. Wie die in Tabelle X mitgeteilten Zahlen zeigen, sinken in dem Versuch 1) (links) mit der Erhöhung der Zuckerkonzentration sowohl die Fett- wie auch die Eiweiß-Koeffizienten ab, während ja in den bisher besprochenen Versuchen stets die Gegensätzlichkeit zu beobachten war. Offenbar ist diese Erscheinung darauf zurückzuführen, daß hier die Fettbildung infolge der hohen Zuckerkonzentration erheblicher hinter der Eiweißbildung zurückbleibt als das normalerweise der Fall ist. Den Beweis dafür ergibt der Versuch 2) (rechts): Nach 3 Tagen ist die Fettbildung bei der hohen Ausgangs-Zuckerkonzentration von fast 9% noch sehr gering, die Eiweißbildung hoch. Prozentgehalt an Eiweiß und Eiweiß-Koeffizient liegen weit über prozentigem Fettgehalt und Fett-Koeffizienten. Nach einem weiteren Tag Lüftung (4 gegenüber 3 Tagen) haben sich die Verhältnisse genau umgekehrt. Auch ökonomischer Koeffizient und absolute Trockensubstanzbildung sind gestiegen. Das normale Bild der Fettbildung, wie es sich bei allen vorherigen Versuchen ergab, ist also lediglich zeitlich etwas verschoben.

Tabelle X. Wirkung steigender Zuckerkonzentration

Differenzierung	Zucker			Lüftungstage	
	5,2%	7,6%	9,5%	3	4
p_H -Wert vorher	6,8	6,8	6,8	6,8	6,8
p_H -Wert nachher	5,4	5,3	5,9	4,7	—
g Zucker vorher in 100 ccm	5,2	7,6	9,5	8,86	8,86
g Zucker verbraucht	4,06	5,73	6,80	5,11	6,49
Fett in %	23,23	19,89	15,73	7,08	23,15
Eiweiß in %	13,81	13,56	14,31	22,75	13,81
Fett-Koeffizient	10,30	6,78	4,16	1,43	6,76
Eiweiß-Koeffizient	6,12	4,63	3,79	4,61	4,03
Ökonomischer-Koeffizient	44,33	34,11	26,46	20,25	29,20
Je 1 Liter/g					
Trockensubstanz	18,00	19,55	18,00	10,30	18,95
Fett	4,18	3,89	2,83	0,83	4,89
Eiweiß	2,49	2,65	2,58	2,36	2,62

Nährlösung: Versuch 1) 2,5% Weizenkleie-Extrakt, 10% Molke, 0,093% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, sonst wie in Tabelle I; Lüftung 3 Tage. Versuch 2) 2% Weizenkleie-Extrakt, 0,15% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Sonst wie in Tabelle I. Beide Holzzuckerwürze.

Von den Zuckerarten wurde außer Holzzucker (Glykose) auch reine Glykose, weißer und brauner Rohrzucker geprüft. Sie sind, wie zu erwarten, alle verwertbar. Insbesondere fiel die gute Eignung des braunen Zuckers auf, mit dem regelmäßig Fett-Koeffizienten um 15 erreicht wurden, mit weißem Zucker lagen die Werte stets etwas niedriger. Offenbar hängt das mit einem höheren Wirkstoffgehalt des braunen Zuckers zusammen. Von Pentosen wurde Xylose geprüft. In einer Nährlösung mit 1% Weizenkleie-Extrakt und 1,16% reiner Xylose ergab sich nach 2 Tagen Lüftung ein Fett-Koeffizient von 12,94, nach Abzug des für die gleiche Nährlösung ohne Xylose erzielten Wertes verbleibt für die verarbeitete Xylose noch ein Fett-Koeffizient von 7. Diese Pentose ist also recht gut verwertbar, was für die Heranziehung pentosehaltigen Materials zur Züchtung der Fetthefe wichtig ist.

Auf die Stammeigenschaften von *Candida Reukauffi* sei hier nicht eingegangen und nur erwähnt, daß zahlreiche Stämme von verschiedenen Eigenschaften vorkommen, z. B. Stämme, bei denen in Kultur nur Sproßzellen auftreten, zu denen der zu den vorliegenden Versuchen benutzte Stamm gehört, ferner solche, bei denen auch in Kultur die in dem Blütennektar vorhandenen Kreuzformen auftreten. Diese scheinen weniger zur Fettbildung zu neigen, wie zu erwarten ist. Die Stämme unterscheiden sich auch durch ihr Gärvermögen, und es scheinen in den Blüten verschiedenartiger Pflanzen jeweils bestimmte Stämme vorzuherrschen¹⁴.

¹⁴ A. Rippel-Baldes: Nachr. Gött. Akademie d. Wiss., Math.-Physikal. Kl. 1947, S. 17.

Was die Beschaffenheit des Fettes betrifft, so handelt es sich um ein Öl, das alle Eigenschaften zeigt, wie sie auch für das Fett von *Endomyces* und *Oospora* gefunden wurden¹⁵ und dessen Konstanten nahezu die gleichen sind wie bei dem Olivenöl. Wir fanden

Fettkonstanten	<i>Candida</i> -Öl	Olivenöl
Spezifisches Gewicht	flüssig	flüssig
Konsistenz	0,921	0,914—0,920
Unverseifbar	197	185—196
Jodzahl	70	79—94
Verseifungszahl	0,21	0,46—1,40

Ob es sich bei dem gebildeten Fett um eigentliches Reservefett handelt oder in erster Linie um Degenerationsfett, wurde noch nicht geprüft. Die zweite Annahme läge ja nahe in Hinsicht darauf, daß der Vorgang der Fettbildung in der Kultur offenbar ein mehr oder weniger erzwungener ist. Indessen sind die Fettzellen noch keimfähig; sie keimen mit kronenartiger Sprossung aus, so daß sie jedenfalls keine absolut degenerierten Gebilde sind.

Zusammenfassung. Die in Blütennektarien vorkommende *Candida* (*Nectaromyces*) *Reukaufii* verändert bei Lüftungskultur ihre Form völlig. Statt der dort vorhandenen „Kreuzform“ treten Sproßzellen auf (nur bei gewissen Stämmen werden auch in Kultur noch Kreuzzellen gebildet), die unter geeigneten Bedingungen stark verfetten und ein dem Olivenöl ähnliches Öl enthalten. Diese Bedingungen sind: Gute Versorgung mit Wirkstoffen (in erster Linie Biotin), dürftige Ernährung mit Stickstoff, sehr kräftige Lüftung, *pH*-Wert nicht unter 5 bis 4,5. Es werden dann Fett-Koeffizienten bis zu 15 (gelegentlich noch wenig darüber) erzielt. Als Wirkstofflieferanten können Molke und die verschiedenartigsten Pflanzenextrakte herangezogen werden, als Zuckerquellen Holzzucker und Rübenzucker; Xylose wird ebenfalls zur Fettbildung verwertet.

Die Begleiterscheinungen guter Fettbildung sind: Hohe absolute Trockensubstanzbildung, hoher ökonomischer Koeffizient, geringer prozentiger Eiweißgehalt und geringer Eiweiß-Koeffizient. Fett- und Eiweiß-Stoffwechsel verlaufen in diesem Sinne stets gegensätzlich. Die Fettbildung schließt sich an die vollendete Eiweißbildung an, ist somit ein Spätstadium der Entwicklung, das durch die geeigneten Kulturbedingungen offenbar erzwungen wird.

¹⁵ H. Fink, G. Haeseler und M. Schmidt: Zeitschr. f. Spiritusindustrie. 1937. — H. Fink, H. Haehn und W. Hoerburger: Chemiker-Zeitung 61, 689, 723, 744, 1937.

Nachtrag: Soeben wird uns bekannt, daß nach Schopfer und Mitarbeitern Biotin für das Wachstum unserer Hefe unerlässlich ist; Aneurin allein ist unwirksam, steigert aber die Ernte bei Vorhandensein von Biotin, und zwar durch die Pyrimidin-Komponente (W. H. Schopfer und M. Guilloud: Schweizer. Z. f. Pathologie u. Bakteriologie 8, 441, 1945; J. A. Hijner: Experientia, 2, H. 8, 1946).

(Aus den Botanischen Anstalten der Universität Göttingen)

Physiologischer Zustand und Wachstumsintensität bei *Chlorella*.

Von

Hans v. Witsch.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 24. November 1947.)

Bei unseren Untersuchungen über die Substanzproduktion autotropher Mikroorganismen (Harder und v. Witsch 1942 a und b) tauchte bald auch die Frage auf, wieweit der physiologische Zustand des Impfmateri als den Ernteertrag der Kulturen beeinflusste. Eine Reihe von Beobachtungen über das Wachstum von *Chlorella* in Massenkulturen sind an anderer Stelle (v. Witsch 1948 b) bereits mitgeteilt worden. Die Rolle des Impfmateri als wurde dort jedoch nicht erörtert, sie sollte in anderem Zusammenhange gesondert behandelt werden.

Durch die Arbeiten von Czurda (1933, 1935 a, b, 1937) und Ondratschek (1936, 1940, 1941 a, b, 1944) an zahlreichen grünen Algen und Flagellaten ist nachdrücklich auf die große Bedeutung hingewiesen worden, welche der physiologische Zustand einer Algenkultur auf die morphologischen und physiologischen Eigenschaften der gezüchteten Organismen besitzt. Beide Autoren betonen nachdrücklich, daß nur bei Verwendung eines einheitlichen, im Stadium maximaler Vermehrungsfähigkeit befindlichen Zellmateri als (Normalzustand bzw. Konkordanzstadium nach Denk 1942) reproduzierbare Ergebnisse zu erwarten sind. Dies gilt sowohl im Hinblick auf die für die betreffende Art charakteristische morphologische Ausprägung der Zellen, wie vor allem auch für ihre Vermehrungsfähigkeit (Czurda 1935 a, b, Ondratschek 1937, Denk 1942). Ondratschek bringt in seinen Untersuchungen an heterotrophen Flagellaten zahlreiche Beispiele, in welchen der physiologische Zustand des Impfmateri als von maßgeblichem Einfluß auf das Wachstum der jungen Kulturen war (Ondratschek 1940, 1941 a). Diese Arbeiten sind in unserem Zusammenhang auch deshalb von besonderem Interesse, weil es sich bei ihnen ebenfalls um Anzuchten größerer Materialmengen in Flüssigkeitskulturen handelt, die an die Vermehrungsfähigkeit des Impfmateri als viel höhere Ansprüche stellen als einfache Überimpfungen von Agarkulturen in Reagenzgläsern.

In Ondratscheks Versuchen waren die unter sonst gleichen Versuchsbedingungen erzielbaren Erntemengen je nach dem physiologischen Zustande des Impfmateri als ganz verschieden groß. Wurde dieses einer Kultur entnommen, deren Zellen sich noch lebhaft teilten, so war

das Ernteergebnis viel günstiger als beim Ausgehen von älteren, in Teilungsrufe befindlichen Zellen (Diskordanz-, bzw. Degenerationsstadium nach *Denk* 1942). Im ersten Fall wurden nicht nur an sich viel höhere Zelldichten und Erntegewichte erreicht, sondern auch in wesentlich kürzerer Zeit. Abweichend verhielten sich nur einige *Eugleninen*, bei welchen es ohne besondere Bedeutung war, in welchem physiologischen Zustand sich das Impfmateriail befand.

Die im folgenden mitgeteilten eigenen Erfahrungen beziehen sich durchwegs auf *Chlorella*; die verwendete Form wurde bei einem massenhaften Auftreten im Freiland gesammelt und in Klonkultur herangezogen. Die Versuche wurden in der bereits an anderer Stelle (*von Witsch* 1948b) geschilderten Weise in Durchlüftungsrohren in Erd- oder Mineralsalzlösung durchgeführt.

Versuche über die Wachstumsintensität von physiologisch jungem und altem Impfmateriail.

Gelegentliche Beobachtungen hatten die Vermutung nahe gelegt, daß das Alter des Impfmateriails im Gegensatz zu den Angaben der Prager Schule bei *Chlorella* keinen wesentlichen Einfluß auf das Wachstum der Kultur habe.

In einer Versuchsserie z. B. wurden verschieden alte Kolbenkulturen in gleicher Ausgangszelldichte (4 Zellen je Zählkammerfeld, letzteres = $1/160 \text{ mm}^3$) in neue Kolben überimpft. Drei der verwendeten Ausgangskulturen standen bereits 10, 7 bzw. 4 Monate in *Erlenmeyer*-Kolben mit Erdlösung, hatten naturgemäß jegliches Teilungswachstum längst eingestellt und zeigten mit Reservesubstanz vollgepfropfte, gelblich verfärbte Zellen; als Reservesubstanz tritt, wie bereits früher mitgeteilt, fettes Öl auf, das in Form kleiner Tröpfchen in den Zellen abgelagert wird. Als vierte Impfkultur wurde kräftig gewachsenes, erst am Beginn der Speicherphase (*v. Witsch* 1948b) stehendes Material aus einem Durchlüftungsrohr genommen. Nach 17-tägiger Kultur betrug die Zelldichte bei Verwendung des 10, 7 bzw. 4 Monate alten Impfmateriails 131, 146 und 138 Zellen je $1/160 \text{ mm}^3$, bei der letzten Serie 150. Der Zuwachs war in allen Fällen infolge Anzucht bei geringem Licht und niedriger Temperatur (Ostfenster eines ungeheizten Zimmers im Oktober) relativ niedrig. Ein merklicher Einfluß des Alters der zum Impfen verwendeten Kulturen oder gar ein Erlöschen der Teilungsfähigkeit in überalterten Anzuchten ließ sich demnach nicht feststellen. In einem zweiten Falle zeigte das am stärksten verfettete Impfmateriail sogar die besten Zuwachswerte.

Daraufhin wurden besondere Versuche angesetzt, um unter konstanten, optimalen Außenbedingungen, wie sie bei den Versuchen zur Massenkultur von grünen *Algen* entwickelt worden waren (*v. Witsch* 1948b), verschieden vorbehandeltes Impfmateriail vergleichen zu können.

Aus einer 12 Tage alten Erdlösungs-Kolbenkultur, deren Zellen sich in lebhafter Teilung befanden, wurden zwei Durchlüftungsrohre beimpft und bei täglich 16-stündiger Beleuchtung von 3500 Lux und Belüftung mit reiner Luft bzw. unter Zusatz von 0,4% CO_2 aufgestellt. Als Nährlösung diente die

Mineralsalzlösung unter Erdlösungszusatz¹, die schon früher mit bestem Erfolge verwendet worden war und unter sonst günstigen Wachstumsbedingungen leicht Zelldichten von 1000—1500 je 1/160 mm³ erreichen ließ.

Nach 4tägigem Wachstum wurden aus diesen Rohren zwei neue beimpft, die dann wieder das Impfmateriel für das nächste Paar abgaben, und so fort in Abständen von 3—5 Tagen². Durch diese mehrfachen Passagen wurden Kulturen verschiedenen Alters und in verschiedenem physiologischem Zustande erhalten, die dann das Impfmateriel für den Hauptversuch abgeben sollten. Durch die Parallelreihen mit und ohne CO₂-Zusatz wurde die Variation des Impfmateriels noch erhöht.

Bereits die Beobachtung des Wachstums in diesen Rohren zeigte, daß die Teilungsrate mit fortschreitender Passagenzahl nicht anstieg, sondern ganz im Gegenteil laufend absank. In Tabelle I sind die Ergebnisse der Zelldichtebestimmungen zu Beginn und am Ende jeder Überimpfung zusammengestellt. Die durchschnittliche Teilungsfrequenz als

Tabelle I. Durchschnittliche Teilungsfrequenz von *Chlorella* (Anzahl der Teilungsschritte je Zelle und Tag) bei mehrfacher, kurzfristiger Überimpfung und Kultur in Durchlüftungsrohren mit und ohne Zusatz von 0,4% CO₂.

	Kulturdauer in Tagen	Zelldichte				Durchschnittliche Teilungsfrequenz in der Kulturperiode	
		zu Beginn		beim Überimpfen		Luft	CO ₂
		Luft	CO ₂	Luft	CO ₂		
1. Überimpfung	4	2	2	157	315	1,57	1,80
2. "	3	8	8	154	348	1,43	1,83
3. "	4	8	8	228	481	1,20	1,47
4. "	5	8	8	257	761	1,18	1,34
5. "	5	8	8	393	664	1,14	1,27
6. "	3	8	8	91	153	1,17	1,44

Maß für die Wachstumsintensität der Kulturen sinkt in beiden Serien stetig ab. Streng genommen sind natürlich nur die Passagen gleicher Dauer direkt miteinander vergleichbar. Aber auch bei Gegenüberstellung der gleich langen Wachstumsperioden der 1. und 3., 2. und 6. sowie der 4. und 5. Überimpfung kommt das Nachlassen der Teilungsintensität im Laufe des Versuches überzeugend zum Ausdruck. Dann verschwinden auch die scheinbaren, durch verschieden lange Kulturdauer bedingten Unregelmäßigkeiten zwischen 1. und 2. Überimpfung in der CO₂-Serie sowie zwischen 5. und 6. Überimpfung in beiden Serien.

¹ Göttinger Leitungswasser (sehr hart) : 1000 ccm, Mg SO₄ · 7 H₂O : 0,1 g, KH₂PO₄ : 0,04 g, KNO₃ : 0,55 g, Fe-Lactat : 6 mg, 10 ccm Erdlösung, hergestellt durch 4stündiges Kochen einer Mischung von je einem Teil halbfleuchter Gartenerde und Wasser im Dampftopf. Die Abkochung wird dekantiert und ist nach nochmaligem Aufkochen und Abschäumen gebrauchsfertig.

² Die einzelnen Überimpfungen wurden aus versuchstechnischen Gründen in etwas verschiedenen Zeitabständen durchgeführt.

Am Ende dieses Versuches stand also Material von verschiedenem physiologischem Zustande zur Verfügung. Die Zellen in den zuletzt beimpften Röhren befanden sich seit mehreren Übertragungen dauernd im Zustande lebhaftester Zellteilung, die älteren Röhre boten Zellen, die je nach dem Datum der letzten Überimpfung ebenfalls noch im Teilungsstadium standen, oder aber bereits mehr oder weniger in die Phase der Reservestoffspeicherung eingetreten waren. Daneben wurden zum weiteren Vergleich außerdem noch Proben aus dem Kolben, von dem bei der Überimpfung ausgegangen worden war, und von zwei weiteren 15 Wochen alten Kolbenkulturen verwendet. Durch Ansatz von normal belüfteten und von zusätzlich mit 0,4% CO₂ begasten Parallelserien sollte auch hier wieder der Vergleich zwischen guten und optimalen Wachstumsbedingungen ermöglicht werden.

Die gewählte Versuchsanstellung bewirkte durch längere Zeit stärkste Vermehrung des Impfmateri als. Dadurch werden, wie schon eingangs erwähnt, an die Vermehrungsfähigkeit der eingebrachten Zellen viel höhere Ansprüche gestellt als bei normaler und laboratoriumsüblicher Übertragung von Agar- oder Reagenzglaskulturen mit geringen Flüssigkeitsmengen. Das Ziel dieser Versuche war, die Bedeutung des Impfmateri als gerade unter den Bedingungen für Massenkultur kennenzulernen, um zu sehen, wie weit die an kleinmaßstäblichen Kulturen gewonnenen Erfahrungen hierauf übertragen werden können. Es wurden die folgenden Versuche mit je drei Einzelröhren und einer einheitlichen Impfdichte von 2 Zellen je 1/160 mm³ angesetzt und nach 13, 21 und 25 Tagen je ein Rohr jeder Serie geerntet.

I. Impfmateri als aus Kolbenkulturen, im Versuch unter CO₂-Zusatz.

Serie A: Impfmateri als 3 1/2 Monate alte Kolbenkultur. Zellen mit viel Reservesubstanz (32% Fett i. Tr.), Chromatophoren undeutlich, gelbgrün, Zellinhalt schaumig dicht. Farbe der Kultur trüb gelbgrün.

Serie B: Impfmateri als 35 Tage alte Kolbenkultur, bei schwachem Licht und niedriger Temperatur herangewachsen (Ostfenster im Herbst, ohne Heizung). Zellen mit wenig Reservesubstanz (10% Fett i. Tr.). Farbe der Kultur trüb grün.

Serie C: Impfmateri als 35 Tage alte Kolbenkultur, bei gutem Licht und normaler Temperatur herangewachsen. Zellen mit viel Reservesubstanz (29% Fett i. Tr.). Chromatophoren undeutlich, fast gelb, Zellinhalt schaumig dicht. Farbe der Kultur gelb.

II. Impfmateri als aus Durchlüftungsrohren, bei der Anzucht und im Versuch unter CO₂-Zusatz.

Serie D: Impfmateri als 3 Tage alte Kultur in Durchlüftungsrohr nach vorhergehender 6maliger Überimpfung. Zellen mit wenig Reservesubstanz (13% Fett i. Tr.), Chromatophoren deutlich, scharf begrenzt, lebhaft grün, Zellinhalt klar. Farbe der Kultur grasgrün, nicht trüb.

Serie E: Impfmateri als 8 Tage alte Kultur in Durchlüftungsrohr nach vorhergehender 5maliger Überimpfung. Zellen mit wenig Re-

ervesubstanz (13% Fett i. Tr.), Chromatophoren grün, Zellinhalt etwas schaumig. Farbe der Kultur grasgrün, etwas trüb.

Serie F: Impfmateriel 17 Tage alte Kultur in Durchlüftungsrohr nach vorhergehender zweimaliger Überimpfung. Zellen mit sehr viel Reservesubstanz (41% Fett i. Tr.). Chromatophoren undeutlich, gelbstichig grün, Zellinhalt schaumig dicht. Farbe der Kultur trüb gelbgrün.

III. Impfmateriel aus Durchlüftungsrohren, bei der Anzucht ohne, im Versuch mit CO₂-Zusatz.

Serie G: Impfmateriel 3 Tage alte Kultur in Durchlüftungsrohr nach vorhergehender 6maliger Überimpfung. Mikro- und makroskopisches Aussehen wie in Serie D.

Serie H: Impfmateriel 17 Tage alte Kultur in Durchlüftungsrohr nach 2maligem Überimpfen. Zellen mit viel Reservesubstanz (26% Fett i. Tr.), Farbe der Kultur trüb grün.

IV. Impfmateriel aus Durchlüftungsrohren, bei der Anzucht und im Versuch ohne CO₂-Zusatz.

Serie I: Impfmateriel dasselbe wie in Serie G.

Serie K: Impfmateriel dasselbe wie in Serie H.

In Abb. 1 sind die Trockengewichtsernten nach 13 tägiger (schraffiert) und nach 21 tägiger Kultur (kreuzschraffiert) zusammengestellt.

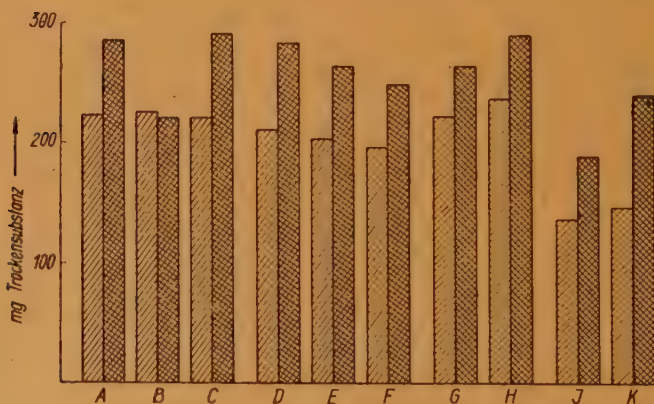


Abb. 1. Trockengewichtsernten je 100 cem Nährlösung bei Verwendung von Impfmateriel in verschiedenem physiologischem Zustande. Ernten nach 13 tägiger Kultur schraffiert, nach 21 tägiger kreuzschraffiert. Nähere Erklärung im Text.

Die Ernten des dritten Rohres jeder Serie nach 25 Tagen boten nichts Neues gegenüber der 21 tägigen Kulturdauer und sind daher der Übersichtlichkeit halber weggelassen worden.

Der Vergleich der einzelnen Serien läßt ohne weiteres erkennen, daß in lebhafter Zellteilung befindliches Impfmateriel keine höheren Erträge liefert, als bereits in der Speicherphase befindliches. Die Serien A und C weisen nicht geringere, sondern sogar höhere Erntegewichte auf als die Serien D und G. Im ersten Falle wurden aber sehr alte, mit Reservestoffen beladene, im Zustand der Speicher-, „degenera-

tion“ befindliche Zellen zum Impfen verwendet, bei der zweiten Gruppe hingegen durch 6malige Überimpfung zu lebhaftester Vermehrung angeregte Zellen im Normalzustande. Der Vergleich der Serien B mit A und C, ferner G mit H und I mit K legt vielmehr den Schluß nahe, daß gerade die mit Reservesubstanz erfüllten, fettreichen Zellen, also im allgemeinen die älteren Kulturen, das günstigste Impfmateriale darstellen, vielleicht mit der Einschränkung, daß die Fettspeicherung nicht über ein gewisses Optimum hinaus fortgeschritten sein darf. Serie F mit 41% Fett brachte etwas geringere Erträge als D und E.³

Die günstigste Wirkung vorhandener Reservesubstanzen kommt besonders deutlich zum Ausdruck, wenn die Assimilationsbedingungen durch Fehlen des CO₂-Zusatzes ungünstiger sind. Die Serien I und K zeigen größere Unterschiede als die Serien G und H, welche den Erfolg der gleichen Impfmateriale, aber bei Weiterkultur unter CO₂-Zusatz wiedergeben.

Auf etwas andere Weise wurde der Einfluß des Impfmateriale in folgendem Versuch geprüft.

In einem größeren, 7 Liter fassenden Durchlüftungsgefäß wurde bei einer Lichtstärke von durchschnittlich 500 Lux eine Kultur angesetzt und die Zelldichte laufend durch Zählung festgestellt. Infolge der geringen Lichtstärke stellte sich schon bei einer Zellenzahl von 60 je Zählkammerfeld ein durch längere Zeit konstant bleibender Endwert ein. (Abb. 2, Kurve I.) Aus dieser Ausgangskultur wurden nun zu verschiedenen Zeiten je 100 cem abgefüllt und in den gewöhnlichen, auch im eben besprochenen Versuch verwendeten kleineren Durchlüftungsrohren bei 8000 oder 4000 Lux weiterkultiviert.

Durch die Übertragung in die kleineren Rohre wurde erreicht, daß das Ausgangsmateriale verschieden lange Zeit nach Beendigung des Zellteilungswachstums durch Erhöhung der Lichtintensität und bessere Durchlüftung zu

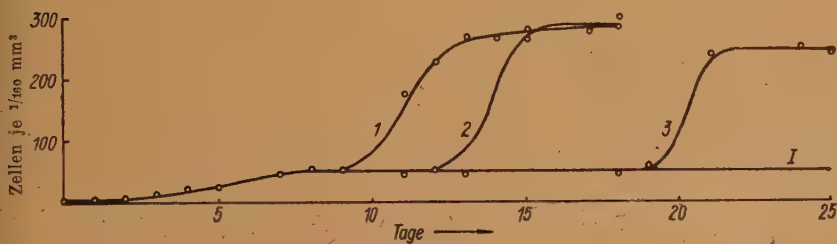


Abb. 2. Zellvermehrung nach Übertragung in günstigere Wachstumsbedingungen bei verschiedenem physiologischem Zustande der Ausgangskultur. Nähere Erklärung im Text.

neuer Vermehrung angeregt wurde. Wenn die Dauer des Verharrens in Teilungsrue auf die Teilungsbereitschaft der *Chlorellazellen* von Einfluß ist,

³ Ein strenger Vergleich der Serien D und E ist leider nicht möglich. Serie D war leider durch einen Zählfehler bei der Zelldichtebestimmung des Impfmateriale um 22,5% zu stark beimpft worden. Zum Ausgleich dafür sind zwar die Trockengewichtswerte in Abb. 1 um 12% reduziert worden, doch dürfte dadurch der Fehler noch nicht voll kompensiert worden sein.

so mußte sich das in irgend einer Weise beim Wiedereinsetzen neuer Zellteilungen nach der Übertragung bemerkbar machen.

Die Ergebnisse dieses Versuches sind in Abb. 2 durch die Kurven der Zelldichten wiedergegeben. Die erste Probe wurde beim Übergang der Stammkultur von der Teilungs- zur Speicherphase entnommen, die zweite drei und die dritte zehn Tage später. (Abb. 2, Kurve 1, 2, 3.) Trotzdem war der Wachstumsanstieg in den beiden später abgezweigten Kulturen sicher nicht geringer, eher schneller und kräftiger als bei Probe 1. Daß Probe 3 einen etwas niedrigeren Endwert aufweist, erklärt sich daraus, daß sie im Zusammenhang mit hier nicht interessierenden Fragen bei nur halber Lichtstärke (4000 Lux) gehalten wurde.

Es ließ sich demnach *auch in diesem Versuch kein Abfall in der Leistung älteren Zellmaterials gegenüber jüngerem feststellen*. Auch längere Zeit nach dem Aufhören von Zellteilungen setzte nach Schaffung günstiger Umweltbedingungen das neuerliche Wachstum der Kulturen ebenso schnell und in mindestens gleicher Stärke wieder ein wie in jüngeren Proben. Eine Wiederholung des Versuches unter etwas anderen Bedingungen brachte dasselbe Ergebnis.

Auf die Vermehrungsfähigkeit von *Chlorella* ist der Übergang vom Konkordanz- zum Diskordanzzustand demnach ohne Einfluß; hingegen erfährt der Ablauf vieler anderer physiologischer Vorgänge in den Zellen starke Veränderungen. An die Stelle des Zellteilungswachstums tritt die Speicherung von Reservematerial, anfänglich noch begleitet von einem beschränkten Größenwachstum der Einzelzellen. Auf einzelne Faktoren, welche auf diese Umstellung im Zellgeschehen von Einfluß sind, ist bereits an anderer Stelle (v. Witsch 1948 b) hingewiesen worden.

Der Vitamin B₁-Gehalt junger und ausgewachsener Kulturen.

Von Interesse für die Beurteilung des Zellzustandes in beiden Phasen ist die Feststellung, daß junges Zellmaterial von *Chlorella* stets reicher an Vitamin B₁ ist als älteres, im Speicherstadium befindliches. Die ersten Beobachtungen darüber sind bereits früher in anderem Zusammenhang mitgeteilt worden (v. Witsch 1946). Inzwischen durchgeführte, weitere Versuche bestätigten und erweiterten die früheren Ergebnisse, so daß sich, wie die folgende Übersicht zeigt, *ein bis ins einzelne gehender enger Zusammenhang zwischen Vitamin B₁-Gehalt und Entwicklungsstadium der Kulturen* nachweisen ließ.

Das für den beschriebenen Versuch der Abb. 1* durch mehrfache Passagen herangezogene, in verschiedenem physiologischem Zustande befindliche Zellmaterial wurde auch auf seinen Vitamingehalt untersucht. Die Aneurinbestimmung erfolgte mittels des Schöpferschen *Phycomycestestes* in der in einer vorangehenden Mitteilung beschriebenen Weise (v. Witsch 1948 a). In Tabelle II sind die Ergebnisse (in γ B₁ je g Trockengewicht) sowie die jeweiligen Fettgehalte der Ernten (in % des Trockengewichtes) als Ausdruck der mehr oder minder weit fortgeschrittenen Reservestoffspeicherung zusammengestellt.

In beiden Serien steigt mit zunehmendem Alter der Fettgehalt stetig an, die einzelnen Werte liegen in der CO₂-Serie stets höher als bei gleichalten Rohren der Serie ohne CO₂-Zusatz, entsprechend den besseren Assimilationsbedingungen und der schnelleren Gesamtentwicklung bei CO₂-Begasung, die ein höheres physiologisches Alter der Kulturen bedingte. Der Aneurin Gehalt verhält sich genau umgekehrt. Von einem Anfangswert von 2,9 γ bei den 8 Tage alten Rohren der CO₂-

Tabelle II. Aneurin- und Fettgehalt verschieden alter Kulturen von *Chlorella* in Durchlüftungsrohren mit und ohne Zusatz von 0,4% CO₂.

Kulturdauer seit der letzten Überimpfung in Tagen	Aneurin Gehalt (in γ je g Trockengewicht) und Fettgehalt (in % des Trockengewichtes) bei Durchlüftung mit:	
	reiner Luft	Luft + 0,4% CO ₂
8	<u>2,9 γ</u> 13%	<u>3,6 γ</u> —
13	<u>2,1 γ</u> 31%	<u>3,1 γ</u> 26%
17	<u>1,7 γ</u> 41%	<u>3,4 γ</u> 26%
20	<u>1,3 γ</u> 44%	<u>2,4 γ</u> 33%
24	<u>1,2 γ</u> 49%	<u>3,1 γ</u> 37%

Serie sinkt der Gehalt mit fortschreitendem Alter bis auf 1,2 γ ab. Den niedrigeren Fettwerten in der Parallelserie entsprechen die höheren Zahlen für Aneurin. Die Werte liegen zwischen 3,6 und 2,4 γ ; auch hier ist das Absinken im Laufe der Entwicklung festzustellen, wenn auch nicht in so regelmäßiger Weise wie in der ersten Serie.

Der enge Zusammenhang zwischen physiologischem Alter und Aneurin Gehalt kommt auch im folgenden Versuch klar zum Ausdruck.

Eine Reihe von Parallelkulturen in Durchlüftungsrohren wurde mit Nährlösung von verschiedenem Salzgehalt sowie mit und ohne CO₂-Zusatz angesetzt. Wie an anderer Stelle (v. Witsch 1948b) mitgeteilt, läßt sich die Zellteilungsphase durch Erhöhung der N-, noch mehr durch Erhöhung der N- und P-Konzentration sehr stark verlängern und intensivieren und auf diese Weise der physiologische Zustand gleich alter Kulturen weitgehend verändern.

Tabelle III zeigt wieder aufs beste die gegenseitige Abhängigkeit der beiden Größen: Auch hier sinkt, mit ganz wenigen Ausnahmen, in allen Serien der Aneurin- und steigt der Fettgehalt im Laufe der Entwicklung.

Darüber hinaus spiegelt sich das physiologische Alter der verschiedenen Kulturen auch im einzelnen im unterschiedlichen Aneurin Gehalt wieder.

Die Höhe der Fettwerte und ihre Zunahme im Laufe der Kultur lassen vor allem im Zusammenhang mit den hier ebenfalls angegebenen Trockengewichten der betreffenden Ernten den Entwicklungszustand der Kulturen erkennen. Wenig verfettete und in starker Gewichtszunahme befindliche Kulturen stehen noch in der Teilungs- oder Wachstumsphase. Sie sind

Tabelle III. Aneurin- und Fettgehalt von *Chlorella* bei Anzucht unter verschiedenen Außenbedingungen und bei steigendem Alter der Kulturen. (Aneurin in γ je g Trockengewicht (unterstrichen), Fett in % des Trockengewichtes, Trockengewichtsernten (Kursivzahlen) in g je 100 ccm Nährlösung).

Serie Nr.	Kulturbedingungen	Kulturdauer bei:			
		Ernte 1 14 Tage	Ernte 2 21 Tage	Ernte 3 28 Tage	Ernte 4 38 Tage
I	Kein CO ₂ -Zusatz, Normallösung	<u>3,9 γ</u> 13 % <i>0,153 g</i>	—	<u>2,6 γ</u> 41 % <i>0,277 g</i>	<u>2,5 γ</u> 45 % <i>0,299 g</i>
II	Kein CO ₂ -Zusatz, dreifache NO ₃ -Konz.	<u>7,7 γ</u> 11 % <i>0,144 g</i>	—	<u>3,7 γ</u> 15 % <i>0,188 g</i>	—
III	0,4% CO ₂ -Zusatz, Normallösung	<u>2,7 γ</u> 22 % <i>0,247 g</i>	<u>2,2 γ</u> 39 % <i>0,313 g</i>	<u>1,7 γ</u> 43 % <i>0,328 g</i>	<u>0,9 γ</u> 48 % <i>0,302 g</i>
IV	0,4% CO ₂ -Zusatz, dreifache NO ₃ -Konz.	<u>3,3 γ</u> 13 % <i>0,265 g</i>	<u>2,2 γ</u> 20 % <i>0,338 g</i>	<u>3,2 γ</u> 27 % <i>0,386 g</i>	<u>2,7 γ</u> 40 % <i>0,371 g</i>
V	0,4% CO ₂ -Zusatz, dreifache K-Konz.	<u>3,8 γ</u> 26 % <i>0,243 g</i>	<u>2,0 γ</u> 41 % <i>0,312 g</i>	<u>1,3 γ</u> 48 % <i>0,353 g</i>	<u>1,1 γ</u> 51 % <i>0,343 g</i>
VI	0,4% CO ₂ -Zusatz, doppelte PO ₄ -Konz.	<u>3,0 γ</u> 19 % <i>0,235 g</i>	<u>1,9 γ</u> 37 % <i>0,332 g</i>	<u>0,8 γ</u> 46 % —	<u>0,7 γ</u> 52 % <i>0,385 g</i>
VII	0,4% CO ₂ -Zusatz, dreifache NO ₃ -, doppelte PO ₄ -Konz.	<u>4,8 γ</u> 12 % <i>0,219 g</i>	<u>2,0 γ</u> 14 % <i>0,370 g</i>	<u>1,9 γ</u> 21 % <i>0,531 g</i>	—
VIII	0,4% CO ₂ -Zusatz, doppelte PO ₄ -, dreifache K- u. NO ₃ -Konz.	<u>3,4 γ</u> 12 % <i>0,224 g</i>	<u>1,7 γ</u> 18 % <i>0,402 g</i>	<u>1,4 γ</u> 26 % <i>0,543 g</i>	<u>1,7 γ</u> 38 % <i>0,668 g</i>

physiologisch jung gegenüber zeitlich gleichalten, stärker verfetteten, die nur noch schwache Gewichtszunahme aufweisen.

In Einklang damit sind die Aneurinwerte, besonders der ersten Ernten, in den Serien II und VII am höchsten, III und VI am niedrigsten, ferner in II höher als in I, in IV höher als in III. Der relativ hohe Anfangswert von V fällt aus der Reihe, die übrigen Werte dieser Serie stimmen mit den übrigen Versuchsdaten wieder gut überein.

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß die *Chlorellazelle* offenbar die Fähigkeit besitzt, ihren *Aneuringehalt* sehr schnell den gegebenen Anforderungen anzupassen. Dasselbe fanden auch Fink und Just (1941) bei ihren Untersuchungen an der Hefe *Torula*. Eine nennenswerte Aneurinspeicherung findet mindestens bei den hier angewandten Kulturbedingungen nicht statt. Sinkt bei abnehmender Vermehrungsintensität der Bedarf an Aneurin, dann wird seine Konzentration in der Zelle sehr schnell herabgesetzt. Mindestens ein Teil davon wird an die Nährlösung abgegeben. Zwar ließ sich im Nährmedium nur ein sehr geringer Gehalt an Vitamin B₁ nachweisen — die stichprobenweise Prüfung ergab rund 5% der in den Algenzellen enthaltenen Menge — doch ist dies leicht verständlich, da nach den Erfahrungen Finks und Justs (1942) an *Torula* bei Kultur im Durchlüftungsverfahren eine rasche Zerstörung des überschüssigen und im Substrat befindlichen Vitamins erfolgt.

Werden andererseits, wie z. B. nach Überimpfung einer älteren, B₁-armen Kultur, plötzlich wieder größere Aneurinkonzentrationen benötigt, dann werden sie auch schnell wieder hergestellt, denn es ließ sich kein Einfluß des Vitamingehaltes des Impfmateri als auf die Aneurinkonzentration der jungen Kulturen nachweisen. Dies folgt schon aus den oben beschriebenen Versuchen, noch deutlicher geht es vielleicht aus den Ergebnissen eines anderen, bereits früher (v. Witsch 1946) erwähnten Versuches hervor. Dort betrug der Aneuringehalt der einzelnen Kulturen bei der ersten Ernte je nach den Versuchsbedingungen 3,4 bis 18,0 γ. Das für alle Kulturen gleiche Impfmateri al war zwar nicht direkt auf seinen Vitamin-B₁-Gehalt getestet worden, doch kann nach dem Alter und den Anzuchtbedingungen der betreffenden Kultur (Durchlüftungsrohre, 4000 Lux Dauerlicht, Laufzeit 14 Tage, Farbe der Kultur trüb gelbstichig grün) ein Wert von 2,5 γ, allerhöchstens 4 γ angesetzt werden. Es hat also nach dem Überimpfen vor allem in jener Kultur, die bei der ersten Ernte 18,0 γ Aneurin aufwies, eine starke und rasche Erhöhung der Vitaminkonzentration stattgefunden.

Besprechung der Ergebnisse.

Nach all diesen Beobachtungen an *Chlorella*, denen sich gleichsinnige an der Diatomee *Nitzschia palea* (v. Denffer 1948) an die Seite stellen lassen, scheint es keinesfalls gerechtfertigt, in der Ablagerung größerer Reservestoffmengen in der Algenzelle schlechthin einen krankhaften Degenerationszustand zu sehen. Die von Czurda und Ondratšek erhobene Forderung, sowohl für taxonomische wie physiologische Untersuchungen nur möglichst einheitliches Material von wohl definiertem optimalem physiologischem Zustande zu verwenden, wird hierdurch in keiner Weise berührt. Man wird aber dem physiologischen Geschehen innerhalb der Algenzellen wohl nicht gerecht, wenn man jede Abweichung vom Zustande maximaler Vermehrungsintensität als ein Anzeichen von krankhaften Veränderungen betrachtet. Nach den hier mitgeteilten Erfahrungen kann die Ablagerung von Reservesubstanzen innerhalb gewisser Grenzen meines Erachtens auch dann nicht als Degenerationserscheinung aufgefaßt werden, wenn sie mit gewissen morphologisch-anatomischen Veränderungen in der Zelle verbunden

ist. Wenn der in der jungen Zelle scharf ausgeprägte und kräftig gefärbte Chromatophor in späteren Stadien durch die Menge der Speicherstoffe zurückgedrängt wird, wenn er unregelmäßig und abgeblaßt erscheint, dann muß dadurch die Teilungsfähigkeit der Zellen keineswegs vermindert sein, wie die geschilderten Versuche beweisen.

Die Befunde von *Ondratschek* an einem Teil der von ihm untersuchten heterotrophen Flagellaten (*Ondratschek* 1940, 1941 a, *Reinhardt* 1944) dürfen demnach keineswegs verallgemeinert werden. Dies zeigen schon die Ergebnisse, die er selbst an heterotrophen oder heterotroph kultivierten *Eugleninen* (1941 b) erhalten hat, deren Verhalten weitgehend dem von *Chlorella* entspricht.

Wenn *Denk* (1942) statt der früher gebrauchten Ausdrücke Speicherdegeneration und Normalzustand (*Czurda* 1933, 1935, 1937) ersteres als krankhaftes, letzteres als gesundes Stadium gewertet, nunmehr von einem Konkordanz- und Diskordanzzustand spricht, so dürfte dies den gegebenen Tatsachen viel eher entsprechen. Durch den Ausdruck Diskordanz wird vor allem zum Ausdruck gebracht, daß Stoffproduktion und Substanzverbrauch nicht im Gleichgewicht stehen, ohne in einem Überwiegen der Stoffproduktion und der Ablagerung von Reservestoffen einen Degenerationsvorgang zu sehen. Aus denselben Gründen wurden hier und auch in den vorangehenden Mitteilungen stets nur die rein beschreibenden Bezeichnungen Teilungs- bzw. Wachstums- und Speicherphase gebraucht.

Der Übergang vom Konkordanz- zum Diskordanzstadium erfolgt, wie *Denk* (1942) und *Reinhardt* (1944) ausführen, ganz allmählich. Dementsprechend sind auch bei ihren Objekten die morphologischen und physiologischen Veränderungen zuerst nur gering; in Übereinstimmung damit läßt sich nach den Erfahrungen *Denks* und *Reinhardts* auch Material, das noch nicht allzuweit vom Konkordanzstadium entfernt ist, relativ leicht und schnell wieder in den Normalzustand zurückversetzen. Mit zunehmender Dauer der Diskordanzbedingungen wird dies immer schwieriger, das Regenerationsstadium dauert immer länger und schließlich, bei zu langem Verharren im Diskordanzstadium, läßt sich der Normalzustand überhaupt nicht mehr wieder herstellen.

Es ist bei Besprechung der *Chlorellaversuche* bereits kurz erwähnt worden, daß bei sehr starker Verfettung (Serie F, S. 133) die Vermehrungsintensität etwas nachließ. Nachzutragen ist in diesem Zusammenhang noch, daß sich in demselben Versuche bei der laufenden Prüfung der Zellenzahl in den ersten Tagen ein Vorsprung der Serien mit drei Tage altem Impfmateriail (Serien D, G, I) feststellen ließ. Die übrigen Serien holten jedoch bald auf und übertrafen vor allem die 3-Tage-Serien an Trockensubstanzgehalt der Einzelzellen. Es war daher bei der ersten Ernte keine Minderleistung des älteren Impfmateriails festzustellen.

Die Verminderung der Teilungsbereitschaft ist bei *Chlorella* in der Speicherphase nur so gering und der Wiedereintritt neuer Vermehrung erfolgt beim Übertragen in neues Medium so schnell, daß eine besondere Regenerationsphase im Sinne *Denks* nur in extremen Fällen und nur

unter Berücksichtigung der ersten Entwicklungsstadien der jungen Kulturen nachgewiesen werden kann. In den Versuchen von *Ondratschek-Reinhardt* hingegen war nicht nur die erreichbare Zelldichte, sondern auch die Trockengewichtsernte bei Verwendung von älterem Impfmateriel dauernd erheblich verringert.

Stellt man die an *Chlorella* gemachten Beobachtungen den Erfahrungen gegenüber, die an der Mehrzahl der untersuchten Flagellaten gewonnen wurden (*Reinhardt* 1944), so läßt sich erkennen, daß zwischen dem fürs erste *so entgegengesetzt erscheinenden Verhalten beider Typen doch nur quantitative Unterschiede bestehen*. Bei *Chlorella* bleibt auch nach Abschluß der Teilungsphase einer Kultur die Teilungsfähigkeit der einzelnen Zellen weitgehend, wenn nicht unvermindert erhalten und wird durch die Einlagerung von Reservesubstanzen nicht beeinträchtigt, falls diese Speicherung nicht in extrem starker Weise erfolgt ist. Auch dann tritt nur ein mäßiger Leistungsabfall ein. Die eingelagerten Stoffe können hier offenbar beim Einsetzen neuerlicher Vermehrung ohne weiteres als Baustoffe mobilisiert und neues Teilungswachstum sofort wieder eingeleitet werden. Impfmateriel mit Reservestoffen ist daher jungem, im Konkordanzzustand befindlichem nicht unterlegen, sondern gibt im allgemeinen höhere Ernten.

Bei den meisten der von *Reinhardt* untersuchten heterotrophen Flagellaten hingegen reagiert die Zelle viel stärker auf den Wechsel vom Konkordanz- zum Diskordanzstadium. Die Teilungsfähigkeit wird schwerer und langsamer wieder hergestellt, die Reservestoffe können offensichtlich nicht so leicht wieder für das neue Wachstum aktiviert werden, und die Zellen machen tatsächlich einen geschädigten Eindruck. Bei Kenntnis nur solcher Formen liegt es natürlich nahe, von Degenerationsvorgängen zu sprechen. Die beiden Reaktionstypen erscheinen also durch eine Reihe von Übergängen miteinander verbunden. An Formen, die im Diskordanzstadium stark verminderte Vermehrungsfähigkeit und Teilungsbereitschaft zeigen (viele heterotrophe Flagellaten), können wir andere reihen, bei denen auch starke Speicherung von Reservesubstanzen und längere Teilungsruhe nur geringen Leistungsabfall bedingen (*Eugleninen*). An diese endlich schließen sich solche an, bei denen auch nach längerer Dauer von Stoffspeicherung und Teilungsruhe kein nennenswerter Abfall der physiologischen Leistungsfähigkeit eintritt. Hierher gehört *Chlorella* und in noch ausgeprägter Weise nach den Untersuchungen v. *Denffers* (1948) *Nitzschia palea*. Bei den letzten Gliedern dieser Reihe die Anhäufung von Reservesubstanzen als Degenerationsvorgang zu deuten, wäre sicher fehl am Platze. Um dem ganzen Problem gerecht zu werden, wird man aber, wie weiter oben vorgeschlagen, vorteilhaft eine Bezeichnung wählen, die nicht, wie wir heute wissen, nur auf einen Teil der vorkommenden Fälle anwendbar ist.

Zusammenfassung.

Es wird zu der Frage Stellung genommen, ob die Ablagerung größerer Fettmengen in Algenzellen als Degenerationsvorgang aufzufassen ist.

An Hand einer Reihe von Versuchen wird gezeigt, daß bei *Chlorella* auch stark verfettetes, in Teilungsrufe befindliches Material bei neuerlichem Überimpfen kein schlechteres, oft sogar besseres Wachstum ergibt als junges mit lebhafter Zellteilung.

Gestützt auf die mitgeteilten Versuche und auf Erfahrungen anderer Autoren wird die Verfettung der *Chlorellazelle* innerhalb weiter Grenzen als reine Reservestoffspeicherung angesprochen, welche die physiologische Leistungsfähigkeit nicht beeinträchtigt und keinesfalls als Degeneration gewertet werden kann.

Es wird versucht, das Verhalten von *Chlorella* und von anderen Formen, welche ein Absinken der Vermehrungsfähigkeit verfetteter Zellen zeigen, von gemeinsamem Gesichtspunkte aus zu verstehen.

Schriftenverzeichnis.

- Czurda, V. 1933. Experimentelle Analyse der kopulationsauslösenden Bedingungen bei Mikroorganismen. I. Untersuchungen an Algen (*Spirogyra*, *Zygnema* und *Hyalotheca*). Beih. Bot. Zbl. **51**, Abt. I., 711.
- Derselbe, 1935 a. Über die „Variabilität“ von *Chlamydomonas eugametos* Moewus. ebenda **53**, Abt. A, 133.
- Derselbe, 1935 b. Über die Begriffe „Typus“ und „Variabilität“ in der Systematik der Algen. ebenda **53**, Abt. A, 158.
- Derselbe, 1937. Conjugatae, in Handb. d. Pflanzenanatomie, II. Abt., Bd. VI.
- v. Denffer, D. 1948. Die planktische Massenkultur pennater Grunddiatomeen. Zugleich ein Beitrag zur Physiologie und Ökologie der *Nitzschia palea* (Kütz.) W. Sm. Arch. f. Mikrobiologie, im Druck.
- Mikrobiologie, im Druck.
- Denk, V. 1942. Der plasmolytische Grenzwert und seine praktische Bedeutung. *Planta* **32**, 630.
- Fink, H. und F. Just. 1941. Über den Vitamin B₁-Gehalt verschiedener Hefen und seine Beeinflussung. *Biochem. Zeitschr.* **308**, 15.
- Dieselben, 1942. Über den Vitamin B₁-Gehalt verschiedener Hefen und seine Beeinflussung V. Die Vitamin B₁-Verluste bei der Züchtung von Hefen im Lüftungsverfahren. Ebenda **311**, 61.
- Harder, R. und H. v. Witsch. 1942 a. Über Massenkultur von Diatomeen. Ber. d. Deutsch. Bot. Ges. **60**, (146).
- Dieselben, 1942 b. Bericht über Versuche zur Fettsynthese mittels autotropher Mikroorganismen. *Forschungsdienst* **16**, 270.
- Lehnartz, E. 1947. Einführung in die chemische Physiologie, Berlin u. Heidelberg.
- Ondratschek, K. 1937. Experimentelle Untersuchungen über die Variabilität einiger Desmidiaceen. *Planta* **26**, 226.
- Derselbe, 1940. Über das Wirkstoffbedürfnis heterotropher Algen. I. Aneurin als Wachstumsfaktor für *Chilomonas paramecium*. Arch. f. Mikrobiologie **11**, 239.
- Derselbe, 1941 a. Über das Wirkstoffbedürfnis heterotropher Algen. II. Aneurin als Wachstumsfaktor für *Polyblepharidineen* und weitere *Chilomonaden*. Arch. f. Mikrobiologie **12**, 46.

- Derselbe*, 1941b. Über das Wirkstoffbedürfnis heterotropher Algen. IV. Aneurin als Wachstumsfaktor für Eugleninen. Arch. f. Mikrobiologie **12**, 229.
- Reinhardt, K.* 1944. Der Stoffwechsel heterotropher Flagellaten. II. Über die Beeinflussung der C- und N-Assimilierung durch einige Faktoren, insbesondere durch Wirkstoffe. Arch. f. Mikrobiologie **13**, 329.
- Schopfer, W. H.* 1939. Vitamine und Wachstumsfaktoren bei den Mikroorganismen, mit besonderer Berücksichtigung des Vitamins B₁. Erg. d. Biologie. **16**, 1.
- Spoehr, H. A.* 1946. Annual report of the chairman of the Division of plant Biology. Carnegie Inst. of Washington Yearbook **45**, 99.
- v. Witsch, H.* 1946. Wachstum und Vitamin B₁-Gehalt von Süßwasseralgen unter verschiedenen Außenbedingungen. Naturwiss. **33**, 221.
- Derselbe*, 1948a. Erfahrungen und Bemerkungen zum Phycomycestest auf Vitamin B₁. Arch. f. Mikrobiologie **14**, 99.
- Derselbe*, 1948b. Beobachtungen zur Physiologie des Wachstums von *Chlorella* in Massenkulturen. Biolog. Zbl. **67**, 95.

(Aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen).

Farbstoffe und Antibiotica bei Actinomyceten.

Von

O. v. Plotho.

(Eingegangen am 21. November 1947).

Während seit Jahren eine umfangreiche Literatur über Vorkommen und Physiologie der *Actinomyceten* vorliegt, wurde fast nichts bekannt über die doch sehr auffallende und charakteristische Verfärbung des Mycels oder des Nährmediums im Verlauf ihrer Kulturzeit. Es schien daher nicht uninteressant, dieser Erscheinung eine nähere Untersuchung zu widmen. Außerdem war es von größtem Interesse, von *Actinomyceten* gebildeten Stoffen nachzuspüren, durch die diese Organismen in neuester Zeit wachsende Bedeutung gewannen, da die betreffenden Stoffe die Fähigkeit besitzen, Bakterien und andere Mikroorganismen zu hemmen oder gar zu töten, so daß die Chemotherapie bakterieller Infektionen durch sie weitgehend angeregt wurde. Die verhältnismäßig große Zahl bereits vorliegender Veröffentlichungen zu diesem Gegenstand beweist die starke Anteilnahme, die ihm entgegengebracht wird¹.

Die Farbstoffbildung.

Zur Beschaffung des Materials für die vorliegenden Untersuchungen wurde eine große Anzahl von saprophytischen aeroben *Actinomyceten*-stämmen nach den üblichen Methoden² aus Böden verschiedenster Herkunft isoliert. Für die Farbstoffuntersuchungen war natürlich die Feststellung grundlegend, ob die in sehr vielen Reinkulturen auftretenden Verfärbungen auf einer echten Farbstoffbildung beruhen, so daß aus Mycelien und Kulturlösungen ein genau zu definierender, kristallisierbarer Farbstoff gewonnen werden kann, oder ob sie zurückgehen auf nicht extrahierbare, mehr oder weniger dunkle, braungelbe bis braunrote Substanzen, die im Zusammenhang stehen mit der chemisch immer noch nicht näher aufgeklärten Humusbildung.

Nach den gewonnenen Ergebnissen können die *Actinomyceten* in bezug auf die Bildung gefärbter Substanzen eingeteilt werden in vier große Gruppen, die als rot-gelbe, rot-blaue, rot-braune^{2a} und farblose

¹ Hallauer, C.: Schweiz. med. Wochenschrift. **74**, 23, 1944; — Krassilnikow, H. und K. I. Koroniako: Microbiology. **8**, 673, 1939; — Nakhimovskaia, N.: ebenda. **6**, 131, 1937; — Waksman, S. A., A. Schatz und D. M. Reynolds, Am. New. York Acad. Sci. **68**, 73, 1946.

² v. Plotho, O.: Arch. f. Mikrob. **11**, 33, 1940.

^{2a} Alle Farbstoffe haben Indikatoreigenschaften: Bei saurer Reaktion tritt die rote, bei alkalischer die zweitgenannte Farbe auf.

Gruppe bezeichnet werden können. Die letztere ist dadurch gekennzeichnet, daß weder im Mycel noch in der Kulturlösung stärker hervortretende Färbungen entstehen, sie schied also für diesen Teil der vorliegenden Arbeit aus. Bei den zur rot-braunen Gruppe gehörenden Organismen wird zu Anfang der Kulturzeit die Lösung tiefrot gefärbt. Bei zunehmender Alkalisierung verschwindet diese Färbung und macht einer tief dunkelbraunen Tönung Platz. Auch sie beruht nicht auf der Bildung eines echten Farbstoffs. Die braunroten, in alten Kulturen mit Salzsäure ausflockbaren Substanzen bestehen vielmehr aus Stoffen, die aufzufassen sind als ein Stadium im Umwandlungsvorgang des Ausgangsmaterials zu den noch nicht näher bekannten Humusstoffen³. In der rot-blauen Gruppe aber finden sich stets in Lösung und Mycel echte, hitzebeständige, kristallisierbare Farbstoffe, unter denen ein häufig auftretender, in saurem Medium roter, in alkalischem blauer, näher untersucht wurde. Ebenso tritt in der rot-gelben Gruppe ein in saurem Substrat roter, in alkalischem Mittel gelber echter Farbstoff auf. In der Tabelle I ist die Löslichkeit der färbenden Substanzen in den gebräuchlichen Lösungsmitteln an einigen typischen Vertretern der drei in Betracht kommenden Gruppen dargestellt.

Tabelle I. Löslichkeit der Farbsubstanzen.

rot-gelbe Gruppe	Äther	Chloroform	Schwefelkohlenstoff	Tetrachlorkohlenstoff	Butylalkohol	Wasser
<i>Stamm 1a</i>	+	+	+	+	+	—
„ 116	+	+	+	+	+	—
„ 41	+	+	+	+	+	—
rot-braune Gruppe						
<i>Stamm F₁</i>	—	—	—	—	+	+
„ F ₇	—	—	—	—	+	+
rot-blaue Gruppe						
<i>Stamm 1</i>	—	—	—	—	—	—
„ 2	—	—	—	—	—	—
„ G ₆	—	—	—	—	—	—

+ = löslich, — = unlöslich.

Die Tabelle zeigt, daß sich die Farbsubstanzen der Stämme aus der rot-braunen Gruppe in Butylalkohol lösen. Das entspricht ihrem soeben umschriebenen Charakter. Melanine gehen nach Ansäuern in Butylalkohol, aus diesem auf Zusatz von Wasser und nach Alkalisierung in das Wasser, mit allen übrigen gebräuchlichen Lösungsmitteln sind sie nicht extrahierbar. Der Farbstoff der rot-blauen

³ Laatsch, W.: Forschungen u. Fortschr. 34, Heft 7/8/9, 84, 1947.

Gruppe ist nur in sehr geringem Ausmaß in der Kulturlösung enthalten und aus ihr mit keinem der gebräuchlichen Lösungsmittel herauszuholen. Er bildet sich aber stets im Mycel und es wird von anderer Seite darauf eingegangen werden, wie er aus diesem gewonnen werden kann⁴. Seine im Mycel enthaltene Menge ist abhängig von der Zusammensetzung des Substrats und geht nicht direkt parallel mit der Menge des gebildeten Mycels, wie aus der Tabelle II hervorgeht.

Tabelle II. Farbstoffbildung und Mycelgewicht von *Stamm 1* in verschiedenen Medien (siehe Tabelle III).
Alter der Kulturen: 18 Tage, Anfangs-pH: 6,8, Kulturtemp. 25—28° C.

Lösung	Farbe d. bewachsenen Lösung	End-pH	Gewicht des Trockenmycels in mg	Reinfarbstoff i. Trockenmycel in %
Tyrosin + Glycerin	dunkelrötlich-blau pi 10 VI, Tafel 2*)	7	110	2,9
KNO ₃ + Glycerin	ungefärbt	6,8	95	kein Farbstoffge- halt bestimmbar
KNO ₃ + Saccharose	"	7,4	90	"
Glykokoll + Glycerin	hellbraun-rot ec VIII, Tafel 1	5,5	200	2,05
Glykokoll + Glyce- rin + 10% Mais- Extrakt	rot-bläulich 14 8 VIII, Tafel 2	6,0	285	10,4**)

*) Die kleine Farbestafel nach *Ostwald*, Ausgabe A.

**) Nach Angabe von *H. Pini*.

Das Mycel wurde auf gewogenem Filter bei 65° C getrocknet, die Gewichtsangaben beziehen sich auf 100 cem Lösung. Die Lösungen enthielten neben den üblichen Salzen 1% Saccharose oder 2% Glycerin als Kohlenstoff- und 1% KNO₃, bzw. die angegebene Aminosäure in äquivalenter Menge als Stickstoffquelle. Als ganz wesentlich fördernd erwies sich, sowohl für das vegetative Wachstum, als auch besonders für die Bildung des Farbstoffs (bis zu der außerordentlich großen Menge von 10,4% in der Trockensubstanz) der Zusatz eines Mais-Extraktes, der gewonnen war aus einer Aufschwemmung von feingemahlten Maiskörnern in Wasser (10 g Mais, 70 cem aq. dest), die nach 24stünd. Stehen im Eisschrank 3 Stunden bei 60—70° C auf dem Wasserbad ausgelaugt, filtriert und im Verhältnis 9:1 der Nährlösung zugesetzt wurde. Ein neutrales pH ist der Farbstoffbildung am günstigsten, die am besten geeignete Nährlösung stellt die Kombination Glykokoll-Glycerin dar. Die Ergebnisse wurden auf colorimetrischem Wege erreicht mit Hilfe einer Vergleichslösung von genau bekanntem Inhalt⁵; die oben angegebenen Resultate beruhen auf Messungen mit Spektralaufsatz, es wurde also die Bandenintensität verglichen.

Im Gegensatz zu dem rot-blauen Farbstoff ist der rot-gelbe durch alle Lösungsmittel extrahierbar. Er wird nur in geringer Menge im

⁴ *Brockmann, H.* und *H. Pini*: Die Naturwissenschaften **34**, 190.

⁵ Zur Herstellung der Vergleichslösung diente der reingewonnene Farbstoff über den von anderer Seite (l. c.) berichtet werden wird.

Mycel, in größerer, wenn auch beschränkter, in der Nährlösung gebildet. In allen Lösungen bleibt in Ruhekulturen während der ersten zwei Wochen die gebildete Farbstoffmenge gering, in der dritten Woche schnellte sie dann beträchtlich in die Höhe und steigt bei längerer Kulturdauer langsam weiter an. In der Tabelle III ist besonders darauf hingewiesen, daß er, wieder im Unterschied zum rot-blauen, reichlicher entsteht bei alkalischem Anfangs- p_H und daß die für ihn günstigste rein synthetische Nährmittelkombination nicht die mit Glykokoll Glycerin, sondern die Zusammensetzung KNO_3 -Dextrin darstellt.

Tabelle III. Bildung des rot-gelben Farbstoffs in verschiedenen Lösungen und bei verschiedenem Anfangs- p_H

Lösung	Zusatz	Alter der Kultur in Tagen	Anfangs- p_H	Reinfarbstoff im ccm in mg
Glykokoll + Glycerin	—	9	6,8	0,034
"	—	9	8,5	0,062
KNO_3 + Dextrin	—	9	6,8	0,062
"	—	9	8,5	0,082
"	10 ccm Maisextrakt	25	6,8	0,220
"	"	25	8,5	0,310

Die beiden in der Tabelle angegebenen Nährmedien wurden als „Grundlösung“ mit den verschiedensten Zusätzen häufig benutzt. Sie enthalten an Nährsalzen 0,1% K_2HPO_4 , 0,2% NaCl, 0,005% $MgSO_4$, 0,001% $FeSO_4$, 0,001% $CaCO_3$ praec, und als Stickstoffquelle 0,05% Glykokoll, bzw. 1% KNO_3 , sowie 2% Glycerin, bzw. 1% Dextrin als Kohlenstoffquelle.

Als Zusatz zur Nährlösung ist für die Entstehung des rot-gelben Farbstoffs, genau wie für die des rot-blauen, der erwähnte Mais-Extrakt sehr förderlich. Als annähernd gleichwertig erwies sich ein Zusatz von 20% Hefe-Extrakt⁶, als noch besser das Hinzufügen von 2—4% corn-steep-liquor⁷. Die Wirkung dieser Zusätze wurde beim rot-gelben Farbstoff wesentlich erhöht, wenn zur sterilisierten Nährlösung 0,5 ccm einer 5%igen sterilen Natriumsulfitlösung zwecks Erniedrigung des Redoxpotentials zugegeben wurde. Diese Maßnahme hatte jedoch auf die Bildung des rot-blauen Farbstoffes keinen Einfluß. Der rot-gelben Pigmentbildung recht förderlich war eine Beigabe von 0,001% $ZnSO_4$, was offenbar auf das „Spurenelement“ Zink zurückzuführen ist.

⁶ 100 g Bäckerhefe + 1 Liter H_2O zwei Stunden im Thermostaten bei 25° C stehen lassen, dann 1/4 Stunde bei 2 Atm. Druck sterilisieren, absetzen im Kühlraum.

⁷ Der corn-steep-liquor wurde in äußerst dankenswerter Weise von der Firma C. F. Hildebrand/Hamburg zur Verfügung gestellt.

Die beiden Farbstoffe stehen also in vieler Beziehung im Gegensatz zueinander, was auf ihre verschiedene chemische Struktur hinweist, über die von anderer Seite ausführlich berichtet werden wird. Die hier angeführten Ergebnisse wurden ebenfalls auf colorimetrischem Wege mittels einer inhaltlich bekannten Vergleichslösung gewonnen (s. oben).

Bei der Reindarstellung beider Farbstoffe fielen nicht unerhebliche Mengen von z. T. aufschließbaren Fettstoffen an, deren Vorhandensein abhängig ist von der Zusammensetzung der Nährlösung, insbesondere von der Anwesenheit von Glycerin. Färberisch läßt sich die Gegenwart dieser Stoffe durch die mehr oder weniger große Säurefestigkeit der betreffenden Stämme nachweisen. Zur Säurefestigkeit wurden bereits bei den *Mycobakterien* eingehende Versuche angestellt⁸, nach denen diese Eigenschaft sich als eine sehr labile, vom Alter der Kultur, der Zusammensetzung des Nährbodens und anderen Faktoren abhängige darstellt. Auch hier wurde bereits darauf hingewiesen, daß sie nach Kultur in glycerinhaltigen Nährböden immer stärker hervortritt als nach dem Wachstum in glycerinfreien Medien. Bei den nahe verwandten *Actinomyceten* liegen offenbar die Verhältnisse ebenso, und Glycerin muß als ein Propagator für Fettbildung bei diesen Organismen angesehen werden.

Die Bildung der Antibiotica.

Im Laufe der Untersuchungen wurden 291 Stämme aus Bodenproben isoliert, unter denen 61 antibakterielle Stoffe bildeten, was einem Anteil von etwa 20% entspricht. *Welsch*⁹ gibt unter allen getesteten, frisch isolierten oder Institutskulturen von *Actinomyceten* einen Prozentsatz von 20—50 an. Es wäre interessant, festzustellen,

Tabelle IV. Verteilung der Antibiotica-bildenden Stämme.

Actinomy.-Gruppe	Zahl der Antibiotica-Bildner	Verhältnis zur Gesamtzahl in %	Hemmungszone in mm		
			1—3	4—8	> 8
farblos	21	7,2	9	8	4
rot-gelb	20	7,0	6	4	10
rot-blau	12	4,2	8	4	0
rot-braun	8	3,0	7	1	0
Gesamtzahl	61	21,4	30	17	17

worauf diese großen Häufigkeitsschwankungen beruhen könnten, ob etwa Umweltbedingungen oder jahreszeitliche Abhängigkeiten oder andere Faktoren in Frage kämen. Der größte Teil der hier geprüften Stämme wurde in den Frühjahrsmonaten des Jahres 1947 isoliert. Die

⁸ v. Plotho, O.: Arch. f. Mikrob. **13**, 93, 1942.

⁹ Welsch, M.: J. Bact. **14**, 571, 1942.

Tabelle IV zeigt die Verteilung der Organismen auf die einzelnen Gruppen.

Die Testergebnisse beruhen nicht auf Verdünnungstesten, sondern wurden von Lochtesten aus Diffusionsgußplatten von 2 mm Schichtdicke abgelesen. Als Gußplatte wurde der von Knöll¹⁰ angegebene Stärke-Dextrose-Trypsinpeptonagar verwendet, der 1% Trypsinpepton, 1% Dextrose und 0,5 pro mille lösliche Stärke enthält. Das Agar wurde mit 3—4 Tropfen einer 24 stündigen Kulturlösung des Teststammes (fast immer *Mycobacterium eos*) bei einer Agartemperatur von 50° C beimpft. Diese Nährbodenzusammensetzung gestattet, mittels einer etwa 20%igen Jodkaliumlösung, den Nachweis von Notatin, einem Ferment der Zuckeroxydation unter H₂O₂ Bildung, das möglicherweise auch hier als Stoffwechselprodukt in Frage kommen konnte. Es wurde jedoch in keinem Fall festgestellt. Aus der Gußplatte wurde mit einem Röhrchen aus nicht rostendem Stahl von 7 mm Durchmesser ein Agarstückchen herausgestanzt und in das entstehende „Loch“ ein Tropfen der zu prüfenden Kulturlösung hineingebracht. Beim Vorhandensein eines Antibioticums entwickelte sich nach 24—30 Stunden bei einer Temperatur von 25—30° eine mehr oder weniger breite Hemmungszone.

Aus der Breite der Zone läßt sich ein Schluß ziehen auf die Wirksamkeit des antibakteriellen Stoffes. Die Stämme mit der kleinen Hemmungszone von 1—3 mm wurden nicht weiter untersucht. Wie aus der Tabelle IV hervorgeht, fand sich in der rot-blauen und der rot-braunen Gruppe kein einziger Stamm von starker antibiotischer Aktivität. In der farblosen und besonders auch in der rot-gelben Gruppe wurden dagegen eine Anzahl hochwirksamer Organismen festgestellt. Die Potenz zur Bildung solcher Antibiotica wechselt stark mit der Zusammensetzung des Kulturmediums und möglicherweise ist der verhältnismäßig niedrige Prozentsatz an höher wirksamen Stämmen in unseren Untersuchungen zurückzuführen auf die rein synthetische „Grundlösung“ Glykokoll-Glycerin, die als Ausgangsmaterial in den meisten Fällen für die Lochteste verwendet wurde und in der jeder weitere organische Zusatz fehlte. Vereinzelt wurde auch eine Glykose-Asparaginlösung von 0,05% Asparagin, 1% Glykose und 0,05% K₂HPO₄ Gehalt, der zur Förderung des Wachstums 0,1% Agar zugesetzt war, als Kulturmedium für die zu testenden Stämme verwendet. Das Ergebnis war nicht schlecht, doch war das Wachstum auf diesem Substrat so gering, daß es nur für ausgesprochen kräftig wachsende Stämme verwendet werden konnte. Unter den hochwirksamen *Actinomyceten* der rot-gelben Gruppe befinden sich die in der Tabelle I bereits aufgeführten Stämme 1a, 116, 41, die sämtlich auch sehr kräftige Farbstoffbildner sind. Von den vier wirksamsten Stämmen aus der farblosen Abteilung gehören zwei zur *Griseus*-Gruppe. Nach Angaben von Waksman und Mitarbeitern aus jüngster Vergangenheit¹¹ repräsentiert *Act. griseus* eine große und verschiedenartige, in der Natur weit verbreitete Gruppe. Seit dem ersten Bericht über das von diesem

¹⁰ Knöll, H.: D. Dt. Gesundheitswesen, Heft 7, Jahrg. 1, 1947.

Organismus gebildete Streptomycin aus dem Jahre 1944¹² seien fast 100 Kulturen von ihm oder naher Verwandter isoliert, jedoch habe nur eine andere Kultur die Fähigkeit besessen, ebenfalls Streptomycin zu bilden. Über die Bildung eines hitzebeständigen Antibioticums aus einer *Griseus*kultur gibt die Tabelle V einigen Aufschluß.

Tabelle V. Bildung des Antibioticums von *Act. griseus*.
Anfangs- p_H 6,8, Temp. 25—28° C.
Testorganismus: *Staphylococcus aureus*. Testorganismus: *Bacterium Flexner*.

Lösung	Alter i. Tagen	End- p_H	Aktivitäts- grenze *)	End- p_H	Alter i. Tagen	Aktivitäts- grenze
KNO ₃ + Dextrin.	5	6,8	0	6,8	5	0
"	10	7,2	50	6,8	10	75
ebenso + Mais + Na ₂ SO ₃	30	8,0	300	8,4	17	500
"	34	8,5	800	8,4	27	1300
Glykokoll + Glycerin + 2 ccm Mais-Keimlinge	5	6,6	90	—	—	—
ebenso	45	6,4	7500	—	—	—

*) Die unter dieser Rubrik verzeichnete Zahl gibt an, bis zu welcher Verdünnung der Kulturlösung totale Hemmungswirkung gegen den Testorganismus festzustellen war.

Zunächst sei ausdrücklich festgestellt, daß alle Ergebnisse, über die hier referiert wird, aus Ruhekulturen stammen, da leider keine Möglichkeit bestand, Schüttelkulturen anzulegen. In Ruhekulturen beginnt die Antibioticabildung in der Regel erst nach dem fünften Tag, was darauf zurückzuführen sein dürfte, daß zu Anfang der Kultur das p_H absinkt und das Antibioticum sich erst dann bilden kann, wenn das p_H einen Wert, der um den Neutralpunkt herum liegt, wieder erreicht hat. Ähnliche Verhältnisse liegen bei der Penicillinbildung vor. Nach Angaben von *Waksman* und Mitarbeitern erreicht bei *Actinomyces* das Wachstum in Ruhekulturen etwa am zehnten Tag sein Maximum¹³, was von uns bestätigt werden konnte. Das p_H liegt dann schon über dem Ausgangs- p_H und steigt mit fortdauernder Kulturzeit schnell erheblich an. Diese Tatsache muß auf verstärkte Autolyse und damit Mycelverfall zurückgeführt werden; eine Mycelzunahme tritt jedenfalls nicht mehr ein. Mit fortschreitender Kulturzeit steigt aber auch die Aktivitätsgrenze des antibakteriellen Agens, so daß nach unseren Erfahrungen, im Gegensatz zu den von *Waksman* mitgeteilten, der Höhepunkt des vegetativen Wachstums — wenigstens in Ruhekulturen — nicht zusammenfällt mit der höchsten Aktivitätsgrenze des

¹¹ *Reynolds, D. M., A. Schatz und S. A. Waksman: Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **64**, 50, 1947.

¹² *Schatz, A., E. Bugie und S. A. Waksman: Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **55**, 66, 1944.

¹³ *Waksman, S. A., A. Schatz und H. C. Reilly: J. Bact.* **51**, No. 6, 1946.

gebildeten Antibioticums. Der Zusatz von 10% eines Extraktes von *Mais* besitzt eine erheblich fördernde Wirkung auf die Bildung des antibiotischen Stoffes und ebenso ist die durch die Zugabe von Na_2SO_3 erreichte Erniedrigung des Redoxpotentials von wirkungssteigerndem Einfluß.

Alle angewendeten Zusätze, unter denen weiter unten z. B. ein Hefe-Zusatz erwähnt wird, werden aber in der Wirkung weit übertroffen von einem Extrakt aus *Maiskleie*. Die darin enthaltenen Mais-Keimlinge machen nur ein Fünftel bis ein Sechstel des Mais-Gewichtes aus, der Hauptinhalt des Maiskorns, die Stärke fehlt ihnen nahezu vollständig, sie enthalten aber viel Eiweiß und Fett und wahrscheinlich sehr viele Vitamine. Der Extrakt wurde etwas stärker mit destilliertem Wasser verdünnt als das Maismehl (10 gr Mais-Keimlinge, 90 cm aq. dest.), im übrigen aber der Extrakt auf die beim Mais-Extrakt angegebene Weise hergestellt. Die stimulierende Wirkung äußerte sich schon darin, daß bereits am 5. Tag im Gegensatz zu allen übrigen Ansätzen eine nicht ganz geringe antibiotische Wirksamkeit eintrat und diese übertraf nach längerer Kulturzeit weitaus alle anderen Hemmungswirkungen. Wir haben in den Mais-Keimlingen offenbar eine spezifische Substanz vor uns, die in hohem Grade fähig ist, die Aktivitätsgrenze eines antibiotischen Agens zu steigern, ähnlich wie sie im corn-steep-liquor, der ebenfalls ein Mais-Produkt ist, vorliegt. *Waksman* hat vorgeschlagen¹⁴, ein Medium, das einen solchen Bestandteil enthält, „Aktivitätsfaktor“ zu nennen, im Gegensatz zu der bereits für maximale Zellbildung gebräuchlichen Bezeichnung „Wachstumsfaktor“. Wir halten diesen Ausdruck für sehr bezeichnend, besonders da das vegetative Wachstum in der Tat auch in unserem Falle nicht gefördert wurde. Ebenso wurde die Mycelbildung auch durch corn-steep-liquor nicht begünstigt und auch ohne ihn wurde Antibioticum gebildet, aber mit niedrigerer Aktivitätsgrenze. Also sind Mais-Keimlinge und corn-steep-liquor kein Wachstums-, sondern ein Aktivitätsfaktor. Die Mais-Keimlinge waren nicht entölt. Auch im Hefe-Extrakt liegt ein Wirkungsfaktor vor, er ist jedoch von geringerer Wirksamkeit.

Es wurde versucht, über die in den Aktivitätsfaktoren wirksamen Stoffe einige Klarheit zu gewinnen und insbesondere festzustellen, ob der fördernde Einfluß auf einige bei einem nahen Verwandten der *Actinomyceten*, dem *Bact. bifidum*, sehr wirksame Vitamine zurückgehen könnte¹⁵. Zu diesem Zwecke wurde zu der Grundlösung Glykokoll-Glycerin ein Zusatz von 0,001% Cystin, 0,005% l Ascorbinsäure und 0,001% p Aminobenzoessäure hinzugegeben. Dieser Zusatz blieb auf Farbstoff- und Antibioticumbildung jedoch ganz wirkungslos. Weiter wurde ein Zusatz hergestellt, der auf 100 ccm der erwähnten Grundlösung die bisher bekannten Vitamine des B-Komplexes in folgender Größenordnung enthielt: 250 γ Lactoflavin, 125 γ B₁, 250 γ B₆, 250 γ

¹⁴ *Waksman, S. A., A. Schatz und H. C. Reilly: J. Bact. 51, No. 6, 1946.*

¹⁵ *v. Plotho, O.: Ztbl. Bact. I Orig. 152, 90, 1947.*

Folinsäure, 475 γ pantothensaures Natrium, 2500 γ Nicotinsäureamid. In einer zweiten Versuchsserie wurden diese Vitamine in verdoppelter Konzentration gegeben. Beide Versuchsreihen blieben auf die Bildung von Farbstoff und Antibioticum ohne merklichen Einfluß. Trotz wiederholter Ansätze, in denen auch das Ausgangs- p_H gewechselt wurde, gelang es also nicht, über die Natur der Aktivitätsfaktoren nähere Aufschlüsse zu gewinnen.

Der Einfluß des Ausgangs- p_H auf die Bildung des Antibioticums ist für drei näher untersuchte Stämme aus der Tabelle VI deutlich erkennbar.

Tabelle VI.

Einfluß des Anfangs- p_H auf die Antibioticumbildung.
Temperatur 25–28° C. Testorganismus: *Staphylococcus aureus*.

Stamm 1a	Lösung	Anfangs- p_H	End- p_H	Alter in Tagen	Aktivitätsgrenze
	KNO ₃ + Glycerin	8,5	7,6	19	200
	"	6,8	7,4	19	500
Stamm 116	KNO ₃ + Glycerin	8,5	7,0	18	200
	"	6,8	7,2	18	600
<i>Ac. griseus</i>	KNO ₃ + Dextrin	8,5	7,9	22	300
	"	6,8	8,0	22	600

Überall liegt die Aktivitätsgrenze bei gleichen Versuchsbedingungen höher bei neutraler Reaktion der Lösung zu Beginn der Kultur als bei alkalischer. Das trifft für alle untersuchten Stämme zu und ist offenbar von allgemeiner Gültigkeit.

Die Tabelle VII zeigt die Wirkung der am häufigsten verwendeten Zusätze zur Grundlösung Glykokoll-Glycerin auf Antibioticum- und Farbstoffbildung verschiedener Stämme der rot-gelben Gruppe am Beispiel des Stammes 1a. Diese Grundlösung ist für die Bildung des antibakteriellen Stoffes die vorteilhafteste, während der Farbstoff reichlicher entsteht in der KNO₃-Dextrinlösung.

Aus der Tabelle geht hervor, daß ein 20%iger Hefe-Extraktzusatz eine beachtliche Erhöhung der Aktivität des Antibioticums bewirkt, daß aber sein Einfluß auf die Farbstoffbildung sehr gering ist. In dieser Beziehung wird er von dem Mais-Extrakt übertroffen, der gleichzeitig auch die Bildung des Antibioticums stark fördert. Der beste Propagator für beide Faktoren ist aber zweifellos der corn-steep-liquor, wenn er in entsprechender Konzentration zugesetzt wird. Die Zugabe von 1 cem auf 100 cem Lösung blieb wirkungslos und 4 cem gaben keine Erhöhung mehr. Die Erhöhung der Aktivitätsgrenze in der letzten Spalte der Tabelle hat ihre Ursache in der längeren Kulturdauer des betref-

fenden Ansatzes. Bei gleicher Kulturdauer übersteigt die Aktivitätsgrenze aus der corn-steep-Lösung alle anderen.

Tabelle VII. Einfluß verschiedener Zusätze auf Antibioticum und Farbstoff von Stamm 1a. Testorganismus: *Staphylococcus aureus*.

Lösung	Anfangs-pH	End-pH	Alter in Tagen	Aktivitätsgrenze	Reinfarbstoff/ccm, in mg
Glykokoll + Glycerin	6,8	7,2	15	300	0,082
ebenso, aber + 20% Hefe-Extrakt + Na ₂ SO ₃	6,8	7,0	15	750	0,08
ebenso, aber + 10% Mais-Extrakt + Na ₂ SO ₃	7,0	7,2	15	750	0,11
ebenso, aber + 1 ccm corn-steep-liquor + Na ₂ SO ₃	6,8	8,2	17	300	0,084
ebenso, aber 2 ccm corn-steep-liquor + Na ₂ SO ₃	6,8	8,2	17	1100	0,128
ebenso, aber 4 ccm corn-steep-liquor + Na ₂ SO ₃	6,8	8,2	17	1100	0,14
ebenso, aber 20% Hefe-Extrakt + Na ₂ SO ₃	6,8	8,0	25	1300	0,14

Einen Vergleich der Wirksamkeit der Antibiotica von Stamm 1a und *Act. griseus* übermittelt die Tabelle VIII. Als Kulturmedium diene in diesem Falle ausschließlich die Grundlösung Glykokoll-Glycerin mit

Tabelle VIII. Vergleich der Antibiotica von Stamm 1a und *Act. griseus*

Testorganismus	Stamm 1a Aktivitätsgrenze	<i>Act. griseus</i> Aktivitätsgrenze
<i>Mycobacterium eos</i>	100 000	100 000
<i>Proactinomyces ruber</i>	10 000	7 000
<i>Bacterium Flexner</i>	50	1 300
<i>Bacterium pseudodiphtheriae</i>	50	500
<i>Bacterium coli</i>	100	—
<i>Bacterium paracoli</i>	0	100
<i>Staphylococcus aureus</i>	1 300	750
<i>Bacillus subtilis</i>	750	50
<i>Bacillus mycoides</i>	750	50

dem Anfangs-pH 6,8, zu der 10% Mais-Extrakt zugesetzt war, der zwar nicht die höchste Aktivität ergibt, mit dem aber die meisten Erfahrungen vorlagen.

Aus der Tabelle ist sehr deutlich erkennbar, daß beide antibacteriellen Stoffe gegenüber den nächsten Verwandten der Actinomyceten, den Mycobacterien und Proactinomyceten, am wirksamsten sind, eine

Tatsache, die bereits von *Krassilnikow* und *Koroniako*¹⁶ festgestellt wurde. Bei einer Verdünnung der Kulturlösung von 1:100 000 ist die Aktivitätsgrenze gegen *Mycobacterium eos* tatsächlich noch nicht erreicht, eine weitere Verdünnung wurde jedoch nicht angesetzt, weil die überragende Empfindlichkeit dieses Organismus gegenüber beiden Antibiotica schon aus diesem Verdünnungsgrad mit aller Deutlichkeit hervorgeht. Äußerst empfindlich ist ebenfalls der Vertreter der *Proactinomyceten* aus der Gruppe *ruber*.

Über die Wirkungsbreite der beiden geprüften Substanzen gibt die Tabelle nur geringen Aufschluß. Aus ihr ist lediglich die Unwirksamkeit des von *Stamm 1a* gebildeten Stoffes gegen *Bacterium paracoli*, einem gramnegativen, zur Coligruppe gehörigen Mikroorganismus, der dem *Bacterium typhi* nahe verwandt ist, ersichtlich, demgegenüber auch bei wiederholten Ansätzen keine Aktivität nachgewiesen werden konnte. Im Gegensatz hierzu war eine Wirksamkeit gegen *Bacterium coli* vorhanden, die allerdings verhältnismäßig gering blieb.

Der allgemeine Charakter der beiden Antibiotica ist aber aus der vergleichenden Übersicht recht gut abzulesen. Es ist unverkennbar, daß die antibakterielle Substanz des *Stammes 1a* beträchtliche Aktivität gegen alle grampositiven Mikroorganismen besitzt (*Proact. ruber*, *Staph. aureus*, *Bac. subtilis*, *Bac. mycoides*), während sie stark zurücktritt gegenüber den gramnegativen (*Bact. Flexner*, *Bact. pseudodiphtherie*). Auf der anderen Seite ist der Stoff von *Act. griseus* den beiden grampositiven Bakterien gegenüber nahezu wirkungslos und seine Wirkungskraft gegenüber dem grampositiven *Staphylococcus* bleibt auch weit hinter der des *1a*-Antibioticums zurück. Die gramnegativen Organismen werden dagegen weitgehend gehemmt, und es dürfte daher nach diesem Befund sicher sein, daß wir es mit zwei verschiedenen antibiotischen Agentien zu tun haben. Es steht heute fest, daß eine größere Anzahl von *Actinomyceten* antagonistische Fähigkeiten besitzen und verschiedene Hemmstoffe zu erzeugen vermögen. *Waksman* und Mitarbeiter geben in einer kürzlich erschienenen Arbeit¹⁷ vier solcher Stoffe an, die kristallisiert werden konnten und weitere vier, die nur teilweise gereinigt wurden. Es bleibt einer späteren Untersuchung vorbehalten, festzustellen, ob in den hier besprochenen Hemmstoffen eines dieser von den amerikanischen Autoren beschriebenen Substrate vorliegt, oder ob es sich um neue Hemmstoffe handelt.

Zusammenfassung.

Es werden zwei Farbstoffe und zwei Antibiotica, die aus frisch isolierten *Actinomyces*-Stämmen gewonnen waren, näher beschrieben und gezeigt, wie durch verschiedene Zusätze die farbstoffbildende und die antagonistische Fähigkeit erhöht werden kann. An Zusätzen wird als besonders wirksam ein Extrakt aus Mais-Keimlingen festgestellt.

¹⁶ *Krassilnikow, H. und K. J. Koroniako: Microbiology. 8, 673, 1939.*

¹⁷ *Waksman, S. A., A. Schatz und D. M. Reynolds.: Am. New York Acad. Sci. 48, Art. 2, 73, 1946.*

Die *Actinomyceten* der rot-blauen Gruppe sind sämtlich sehr kräftige Farbstoffbildner, ihre antagonistische Fähigkeit ist aber verhältnismäßig gering. (Tabelle IV.) Die Vertreter der rot-gelben Gruppe dagegen, die genau so kräftige Farbstoffbildner sind, produzieren hochwirksame Antibiotica. In der farblosen Gruppe werden so gut wie keine Mycel- oder Nährbodenfarbstoffe entwickelt, es erscheinen aber in ihr Organismen mit hervorragender antagonistischer Befähigung. Demgegenüber bleiben wieder die Angehörigen der rot-braunen Gruppe, die ebenfalls keine echten Farbstoffe erzeugen, in der Antibioticabildung zurück.

Über die Anpassung der Bäckerhefe an Galaktose.

Von

Heikki Suomalainen.

(Eingegangen am 27. Mai 1944.)¹

Das Anpassungsvermögen der Hefe, Galaktose zu vergären, ist ja eine schon längst bekannte und vielseitig untersuchte Erscheinung. *v. Euler* und *Jansson* (1) haben sogar gezeigt, daß es sich dabei nicht um eine Veränderung der Cozymase, sondern des Trägeranteils des Zymasekomplexes handelt. Wenn, wie schon *Euler* und *Johansson* (2) dargelegt haben, für diese Anpassung die Neubildung der stickstoffhaltigen Zellsubstanz von entscheidender Bedeutung ist, scheinen die Isomerieverhältnisse bei der Eiweißsynthese mitzuspielen.

Bei diesbezüglichen Untersuchungen hat man üblicherweise *mehrzellige* Kulturen als Ausgangsmaterial benutzt². Obwohl nach *Stephenson* und *Yudkin* (4) die Zellvermehrung — entgegen der allgemeinen, zuletzt von *Rhoades* (5) geäußerten Auffassung — keine Voraussetzung für die Anpassung an Galaktose wäre, ist natürlich unter diesen Umständen das Mitspielen der genotypischen Variation nicht ausgeschlossen. Bei den sporogenen Hefen sind nämlich nach den grundlegenden Untersuchungen von *Winge* (6) nicht die Einzellkulturen, sondern erst die *Einsporen*-Kulturen als reine Linien aufzufassen. Die „reinen“ Hefearten sind nach ihm wohl im Hinblick auf die *konstitutiven* Enzyme — Invertase, Raffinase und Melibiase — immer homozygotisch aufzufassen. Obwohl es sich erwiesen hat, daß das Vermögen, diese konstitutiven Enzyme zu bilden, auch bei der Kreuzung dominant bleibt, schien es jedoch in diesem Falle — in Anbetracht der enzymatischen *Adaptation* — prinzipiell der Prüfung wert zu sein, ob es sich auch dabei um eine grundsätzlich genotypische, homozygote Eigenschaft handelt. Dies gilt besonders für die schwerer anpassungsfähige *Bäckerhefe* weil die Anpassung nach *v. Euler* und *Nilsson* (7) sich weitgehend als von

¹ Diese Arbeit lag bereits fertig gedruckt in Heft 5, Bd. 13, S. 507 vor. Das Heft wurde nach Fertigstellung durch Kriegseinwirkung in der Druckerei zerstört.

² Es ist erstaunlich, daß bei der Untersuchung der Anpassung bei den Bakterien die Isolierung der Einzell-Kulturen so selten in Gebrauch gekommen ist, obwohl man solche für ihre Variabilität bekannte Versuchsobjekte, wie *Escherichia coli*, allgemein gebraucht hat (vgl. 3). Wenn auch die genetischen Verhältnisse der Bakterien noch ganz im Dunkel liegen, so hätte man dadurch doch einen festeren Grund erhalten.

der Heferasse, ja sogar vom Hefestamm abhängig erwiesen hat, sowohl was die zur Erreichung der Endgeschwindigkeit erforderliche Vorbehandlungszeit als auch die Endgeschwindigkeit der Vergärung selbst anbetrifft.

Die erforderlichen Einsporen-Kulturen der Bäckerhefe sind mir durch das freundliche Entgegenkommen von Herrn Prof. Dr. *Øjvind Winge* zur Verfügung gestellt worden, wofür ich ihm auch hier meinen herzlichsten Dank äußern möchte.

Das Material. Die untersuchten Einsporen-Kulturen (Carlsberg Laboratorium Nr. 950—955) sind alle aus dänischer Bäckerhefe (Carlsberg Laboratorium Nr. 245) isoliert. Die Stämme Nr. 952 und 953 sowie andererseits auch Nr. 954 und 955 stammen aus Sporen in demselben Askus. Nach der Angabe von Professor *Winge* haben sie alle diploides Aussehen.

Die Züchtung. Um ihr Anpassungsvermögen an Galaktose zu prüfen, wurden die Kulturen in der Vorbereitungsphase in eine geklärte Melasse-lösung von 4° Balling mit 3% Galaktose („*Kahlbaum*“) unter Zusatz von 1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und derselben Menge Hefeautolysat übergeimpft. — Das Hefeautolysat war durch Umrühren von 25g $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ pro 400 g käuflicher Bäckerhefe und Autolysieren bei 50° C zubereitet worden (8). Es wurde, mit Leitungswasser halb verdünnt, durch Zentrifugieren geklärt.

Die Weiterzüchtung erfolgte dann in 5%iger Galaktose-lösung, versehen wie oben mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und Hefeautolysat.

Da im Hinblick auf die früher erreichten Ergebnisse kein Anlaß vorliegt, hier eingehender auf die Versuchsergebnisse einzugehen, sei nur festgestellt, daß alle angewendeten Hefestämme, insgesamt 6, sich mit Leichtigkeit an Galaktose anzupassen vermochten und sie kräftig zu vergären imstande waren. Die Vergärungsintensität war sogar größer als bei einigen von uns isolierten finnischen Unterhefen.

Zusammenfassung.

Die mit Einsporen-Kulturen der *Bäckerhefe* durchgeführten Versuche weisen darauf hin, daß die untersuchten homozygotischen Bäckerhefestämme durch Anpassung imstande waren, Galaktose zu vergären, so daß diese Erscheinung mit der genotypischen Variation nichts zu tun hat.

Literatur.

- 1) *H. v. Euler* u. *B. Jansson*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **169**, 226, 1927. —
- 2) *H. Euler* u. *B. Johansson*, ebenda **78**, 246, 1912. — 3) *H. Karström*, Ergebnisse der Enzymforschung VII, 350, Leipzig 1938. — 4) *M. Stephenson* u. *J. Yudkin*, Biochem. J. **30**, 506, 1936. — 5) *H. E. Rhoades*, J. of Bact. **42**, 99, 1941. —
- 6) *Ø. Winge*, C. r. Lab. Carlsberg, Sér. physiol. **21**, 77, 1935; *Ø. Winge* u. *O. Laustsen*, ebenda **22**, 99, 1937; **22**, 235, 1938; **22**, 337, 357, 1939. —
- 7) *H. v. Euler* u. *R. Nilsson*, Zeitschr. f. physiol. Chemie. **152**, 249, 1926; *R. Nilsson*, Die Methoden der Fermentforschung II, 1924, Leipzig 1941. —
- 8) Svenska Pappers- och Cellulosaingenjörsföreningens Tekniska Meddelanden CCA **12**, 1942. — 9) *C. C. Lindegren*, Bacteriol. Reviews **9**, 111, 1945.

Nachtrag.

Nunmehr haben *Lindegren* und Spiegelman umfassende Untersuchungen über das Anpassungsvermögen der Hefen an Galaktose

ausgeführt (zusammenfassend in 9). Obwohl es ihnen dabei gelungen ist, auch haploide, Galaktose nicht vergärende Kulturen von *Saccharomyces cerevisiae* zu isolieren, von denen zwar ein kleiner Teil sich später als adaptionsfähig erwies, kommt auch *Lindegren* (9) zu dem Ergebnis, daß es sich hier nicht um Genmutation handelt. Es sind demnach die Befunde auch der genannten Autoren übereinstimmend mit der schon oben geäußerten Schlußfolgerung zu betrachten, daß die Anpassung an Galaktose mit der *genotypischen* Variation der Hefe nichts zu tun hat.

Aber nicht nur des Forschers, sondern auch des Lehrers und des Menschen RIPPEL sei hier gedacht. Zu Beginn seiner Lehrtätigkeit in Göttingen besuchten nur wenige Studenten seine Vorlesungen, mit jedem Semester steigerte sich jedoch ihre Zahl. Schon lange ist das Institut zu klein, um alle Hörer und Doktoranden aufzunehmen.

Sein überaus bescheidenes, gütiges und allzeit hilfsbereites Wesen, hinter dem sich zuweilen überraschend echter Humor verbirgt, deutet auf eine große innere Harmonie des Menschen RIPPEL hin, die sich auch in seinem warmherzigen Familienleben widerspiegelt.

Daß im nunmehr anbrechenden siebenten Jahrzehnt dem Jubilar die ungebrochene Schaffenskraft erhalten bleibe und seine Tätigkeit in Wissenschaft und Lehre weiterhin reiche Früchte trage, das wünschen ihm in aufrichtiger Achtung und tiefer Verehrung Verlag, Freunde und Schüler.

C. STAPP.

(Aus den Botanischen Anstalten der Universität Göttingen.)

Die planktische Massenkultur pennater Grunddiatomeen.

Zugleich ein Beitrag zur Physiologie und Ökologie der
Nitzschia palea (Kütz.) W. Sm.

Von

DIETRICH VON DENFFER.

Mit 16 Textabbildungen.

(Eingegangen am 12. Oktober 1947.)

Auf Grund ihrer ökologischen Ansprüche und ihrer normalen Verteilung in den Gewässern, kann man die Süßwasserdiatomeen bekanntlich in zwei große Gruppen einteilen: in die *Planktondiatomeen* und die benthonischen *Grunddiatomeen*. Zu den Euplanktonen gehören neben einer kleineren Zahl apheloser und dementsprechend bewegungsunfähiger Formen aus der Ordnung der *Pennales* in erster Linie die stets bewegungsunfähigen *Centrales*, während die Grunddiatomeen umgekehrt in ihrer Mehrzahl der Ordnung der *Pennales* angehören.

Die Grunddiatomeen lassen sich ihrerseits weiter aufgliedern in die kleinere Gruppe der Aufwuchsformen oder Epiphyten, die dem Substrat mit besonderen Befestigungsorganen angeheftet sind, und die große Gruppe der freilebenden, stets mit einer Raphe versehenen, eigenbeweglichen *Grunddiatomeen*, mit deren Massenkultur sich die folgende Abhandlung beschäftigt.

Während die Kultur der freibeweglichen pennaten Grundformen bei der Verwendung fester Substrate, auf denen sie umherkriechen können, mühelos gelingt, stieß ihre Massenkultur in größeren Nährstoffmengen, in denen die Zellen künstlich freischwebend erhalten wurden, auf erhebliche Schwierigkeiten. Die Vermehrungsintensität blieb in derartigen Planktonkulturen stets ganz erheblich hinter derjenigen auf fester Unterlage zurück, und es erschien daher zunächst so, als bedürften die Zellen, um sich normal vermehren zu können, unbedingt einer festen Auflage (HARDER u. v. WITSCH, 1942).

HARDER und v. WITSCH haben mit gutem Erfolg versucht, dieser Schwierigkeit dadurch zu begegnen, daß sie locker geschichtete Glaswolle als Substrat in die Kulturkolben und die durchlüfteten Kulturrohre füllten. Diese Methode stellt auch heute noch für die Mehrzahl der freibeweglichen pennaten Diatomeenarten die einzige Möglichkeit dar, um zu nennenswerten Ernteerträgen zu kommen; gegenüber der rein planktischen Kultur hat sie aber immer noch einige erhebliche Nachteile aufzuweisen:

Einerseits ist die Lichtverteilung in den Glaswollekolben naturgemäß sehr ungünstig; ein großer Teil des einfallenden Lichtes wird beim Durchgang durch die Glaswollschicht, besonders wenn diese in den fortgeschrittenen Entwicklungsstadien der Kultur von einem dichten braunen Diatomeenbewuchs überzogen ist, absorbiert, so daß die von der Lichtquelle abgewandte Seite der Kulturen gegenüber der Frontseite stark benachteiligt ist, was sich deutlich in einem schlechteren Wachstum der Diatomeen an der Rückseite der Rohre zu erkennen gibt. Andererseits bleibt auch die Durchlüftung der mit Glaswolle gefüllten Rohre unbefriedigend, weil der Luftstrom darin stets nur wenige ganz bestimmte Bahnen benutzt, so daß nicht alle Teile der Kultur gleichmäßig belüftet werden. Vor allem aber birgt die Kultur auf Glaswolle bei der technischen Gewinnung und Aufarbeitung des Zellmaterials erhebliche Nachteile gegenüber der rein planktischen Kultur in sich, da sich die Diatomeen nur in verhältnismäßig mühseligen Arbeitsgängen restlos von den Glaswollefäden absondern lassen.

Nun war es theoretisch nur schwer verständlich, warum die *Grunddiatomeen*, die ja — besonders in fließenden Gewässern — häufig zu einem erheblichen Prozentsatz als fakultive Planktonten auftreten, durchweg nicht in der Lage sein sollten, sich freischwebend zu vermehren. Bei der Überprüfung einer großen Zahl beweglicher Grunddiatomeen von den verschiedensten Standorten aus der Umgebung der Stadt Göttingen und aus dem Oberharz gelang es denn auch tatsächlich mehrere typisch benthonische Arten aufzufinden, die sich auch in planktischer Kultur zu kräftiger Vermehrung bringen lassen und in dieser Hinsicht echten Planktonorganismen kaum mehr nachstehen.

Neben verschiedenen kleineren *Naviculéen* hat sich in diesen Versuchen besonders die im Benthos unserer Seen, Teiche und Flüsse verbreitete *Nitzschia palea* ausgezeichnet in planktischer Kultur entwickelt. Diese Art beansprucht auch schon deshalb ein besonderes Interesse, weil sie durch die gründlichen Arbeiten von RICHTER (1906), der bei ihr zum erstenmal in absoluten Reinkulturen die Ernährungsbedingungen der Diatomeen eingehend studiert hat und damit die Grundlage für alle heute verwendeten Diatomeennährlösungen lieferte, sowie durch die neueren Untersuchungen von BARKER (1935), der in einer gründlichen Untersuchung ihre Assimilation mit derjenigen der planktischen Meeresform *Nitzschia closterium* verglichen hat, zu den bestuntersuchten Diatomeen überhaupt gehört, so daß wir uns unter Hinzuziehung der auf den folgenden Seiten mitgeteilten Versuchsergebnisse ein recht gutes und abgerundetes Bild von ihren ökologischen Ansprüchen machen können.

A. Material und Methode.

1. Die natürliche Verbreitung der *Nitzschia palea*.

Nitzschia palea gehört zu den gemeinsten und anspruchlosesten der einheimischen Diatomeenarten. Sie kann als ausgesprochener Ubiquist bezeichnet werden.

Ihrer ganzen Natur nach scheint sie zunächst ein typischer Bewohner des Benthos zu sein, wo sie an Teich- und Grabenrändern häufig in großer Menge auftritt. HUSTEDT bezeichnet sie einmal als einen „typischen Bewohner verschmutzter Gewässer“ (1925, S. 567). Man begegnet ihr jedoch fast ebenso

häufig auch an den verschiedensten aerischen Standorten (KOLBE, 1932) wie z. B. in den feuchten Uferböden der Seen und Teiche, von wo aus sie nicht selten bis in verhältnismäßig trockene Gebiete vordringt. BRENDENÜHL (1948) fand sie u. a. in feuchten Wiesenböden, auf Getreideäckern, in verschiedenen Waldböden (und zwar sowohl in Nadel- als auch in Laubwäldern), in der Erde von Gartenwegen, in Moospolstern auf Steinen und selbst auf dem gewiß nicht extrem feuchten Burghof der Hohen Salzburg. Der zu den folgenden Untersuchungen benutzte Klon wurde aus einer Erdprobe isoliert, die im Juni 1945 auf einem trockenen, südexponierten Rasenstück am Fußweg von Schierke zum Brocken gesammelt worden war.

Andererseits findet man die Art jedoch gar nicht selten auch im Plankton der Flüsse und Seen, wohin sie zweifellos rein passiv durch Strömungen aus der Uferregion verfrachtet worden ist. Derartiges tycho-planktisches Auftreten ist z. B. von UTERMÖHL mehrfach in verschiedenen ostholsteinischen Seen beobachtet worden (1925, S. 434)¹. Auch epiplanktisch als Aufwuchs auf *Microcystis aeruginosa* ist *Nitzschia palea* beobachtet worden (nach LEMMERMANN, zitiert bei HUBER-PESTALOZZI, 1941 II/2, S. 530). Die ökologische Valenz der Art ist also ungewöhnlich groß und reicht von rein edaphischen Standorten bis in das Tychoplankton, wo sie offenbar durchaus noch ihr zusagende Lebensbedingungen findet.

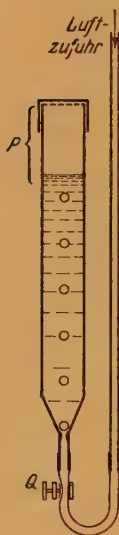
So ist es verständlich, warum gerade diese Art für die planktische Massenkultur besonders geeignet sein mußte. Es kommt lediglich darauf an, die Wirkung der Schwerkraft, die die Zellen normalerweise in kurzer Zeit zu Boden sinken läßt, durch geeignete Maßnahmen zu kompensieren. Die Sinkgeschwindigkeit in destilliertem Wasser beträgt im Normalzustand etwa 15—30 mm/min. und kann, je nach dem Grade der Verfettung (s. u.), bis auf 0,1—1,0 mm/min. heruntergehen. Eine geringe turbulente Bewegung des Wassers, wie man sie leicht durch einen hindurchgeleiteten Luftstrom erzielen kann, genügt daher, um die Zellen dauernd freischwebend zu erhalten. Auf die Bedeutung des Diatomeenfettes für die Planktongenese wird im Abschnitt D noch einmal zurückzukommen sein.

2. Kulturmethodik.

Die Kultur erfolgte in 25 cm hohen Glasrohren von 30 mm Durchmesser (Abb. 1), die an ihrem unteren Ende konisch zugespitzt waren und

¹ In erhöhtem Maße dürfte von *Nitzschia palea* gelten, was UTERMÖHL über *Nitzschia acicularis* schreibt, die — gleichfalls ursprünglich litoralen Ursprungs — zeitweilig in noch erheblich größeren Mengen im freien Plankton auftreten kann als *Nitzschia palea*: „Diese Art ist eben keine Planktonform, sondern wird durch Strömungen ins freie Wasser hinaus verschlagen, was ich gelegentlich ganz deutlich auch daran habe erkennen können, daß ich sie an kleineren oder größeren Detritusbrocken angetroffen habe, die nach heftigen Stürmen eine Zeitlang im Wasser schwebten. Manche Zellen mögen davon hinabgleiten und dann vielleicht wegen ihres geringeren spezifischen Gewichtes noch eine Weile im Wasser anzutreffen sein, wenn die größeren Detritusteilchen bereits zu Boden gesunken sind. Oft dürften die Zellen aber auch von Litoralpflanzen, von am Ufer eingerammten Pfählen und ähnlichen Standorten ohne größere Detritusmengen hinausgerissen sein. Jedenfalls trifft man sie gleich nach länger anhaltenden Stürmen oft ganz besonders häufig im freien Wasser an.“ UTERMÖHL bezeichnet daher diese beiden Formen mit Recht als „Erratoplankton“ (1925, S. 435/36).

von hier aus mit Hilfe einer elektrisch betriebenen Druckluftpumpe durchlüftet wurden. Der durch Wattefilter sorgfältig gereinigte Luftstrom wurde so einreguliert, daß etwa 20—30 erbsengroße Luftblasen in der Sekunde die Kulturflüssigkeit durchperlen, was einer Belüftungsintensität von etwa 8—12 Litern in der Stunde entspricht.



Als Lichtquelle diente eine wassergekühlte 300 Watt-Osramlampe. Die Lichtintensität an der der Lichtquelle zugewandten Seite der Kulturrohre betrug, soweit nicht ausdrücklich anders bemerkt, 10 000 Lux². Die Nährlösung hatte eine Durchschnittstemperatur von 25° C.

Als günstigste Nährlösung für die planktische Kultur hat sich eine Modifikation der bekannten von HÄMMERLING angegebenen Erdschreiber-Lösung erwiesen (HÄMMERLING, 1931, Fußnote S. 635. Vgl. auch PRINGSHEIM, 1924 und 1936). Die allen folgenden Versuchen zugrunde liegende „Normal-lösung“ hatte folgende Zusammensetzung: 800 ccm Aq. bi-dist., 200 ccm Erddekot (Herstellungsanweisung bei HÄMMERLING, 1931), 0,2 g NaNO₃, 0,04 g Na₂HPO₄, 0,1 g Na₂SiO₃. Die Teilungsfreudigkeit war in dieser Nährlösung bei planktischer Kultur nicht schlechter als bei der Kultur auf festem Substrat. Je nach der Größe der Zellen erfolgten die Zellteilungen unter optimalen Kulturbedingungen in Abständen von 9—30 Stunden. Im Laufe eines Tages kann also die Ausgangszellzahl u. U. mehr als vervierfacht werden.

Abb. 1. Kulturrohr für die planktische Massenkultur pennater Grunddiatomeen. Durchmesser des Rohres 3 cm, Länge 25 cm. Inhalt 250 cm³. Der oberste Abschnitt (p) des Rohres ist paraffiniert. Die Luftzufuhr wird durch den Quetschhahn Q reguliert.

Um ein Anhaften und Eintrocknen des Spritzwassers mit den darin enthaltenen Nährsalzen und Diatomeen zu verhindern, wurde der oberste Abschnitt der Kulturrohre bis etwa 10 mm unterhalb des Nährlösungsspiegels mit einer dünnen Paraffinschicht überzogen. Die bei der Durchlüftung verdunstete Wassermenge wurde täglich durch destilliertes Wasser ersetzt.

Die Zelldichte wurde mit Hilfe eines Haemocytometers nach FUCHS-ROSENTHAL bei etwa 50-facher Vergrößerung bestimmt. Sämtliche Ergebnisse sind aus den Zählungen von zwei bis vier Parallelkulturen gemittelt. Fast alle Versuche wurden mehrfach mit dem gleichen Ergebnis wiederholt.

Lediglich die Temperaturversuche konnten aus technischen Gründen nicht mit derartigen Planktonkulturen durchgeführt werden. An ihrer Stelle wurden zur Bestimmung des Temperaturoptimums Agarstreukulturen verwendet: Kleine Petrischalen von 60 mm Durchmesser wurden mit einer etwa 2 mm hohen Schicht 1,5%-igen Nähragars ausgegossen. Da sich herausstellte, daß die oben angegebene „Normalkonzentration“ der Nährsalze in Agarnährböden bereits überoptimal war und ein schlechteres Wachstum ergab, als eine auf die Hälfte verdünnte Normallösung (n/2), wurden sämtliche

² Sämtliche Lichtintensitäten gemessen mit der Standard-Photo-Zelle nach Dr. B. LANGE (vgl. B. LANGE: Die Photoelemente und ihre Anwendung, Leipzig, 1936, 2. Teil, S. 19).

kulturen (also auch die Stammkulturen) mit dieser schwächeren Nährung angesetzt³.

Zur Beimpfung der Platten wurde zunächst von einer geeigneten Stammkultur unter sterilen Bedingungen eine Diatomeenabschwemmung in normaler Kulturlösung hergestellt, die auf etwa 10 Zellen je cmm verdünnt und darauf in 5 mm hoher Schicht auf die vorbereiteten Agarplatten ausgegossen wurde. In etwa 30 Minuten sinken sämtliche Diatomeen zu Boden und setzen sich in gleichmäßiger Verteilung auf der Agaroberfläche fest, so daß die überschüssige Nährlösung durch vorsichtiges Dekantieren ohne Zellschaden wieder entfernt werden kann. Die derart beimpften Schalen können nach kurzem Trocknen der Agaroberfläche für die Versuche verwendet werden. Die Zählung erfolgte bei etwa 50-facher Vergrößerung mit Hilfe des Netzkulars von der Schalenrückseite aus, ohne den Deckel zu lüften.

Zur Herstellung der verschiedenen Temperaturstufen diente eine elektrisch beheizte Metallplatte von 120 cm Länge und 20 cm Breite mit auf der Oberseite verschieden dicht aufgewundenem Heizdraht. Um das Austrocknen des Agars in den höheren Temperaturstufen zu verhindern, standen die Kulturen jeweils in einer zweiten größeren Petrischale in einer wasserdampfsättigten Atmosphäre. Die Temperatur in den einzelnen Schalen wurde mit Hilfe von kleinen Thermometern, die in den Kulturschalen selbst untergebracht waren, laufend kontrolliert. Die angegebenen Werte waren während der gesamten Versuchsdauer praktisch konstant. Die Lichtintensität an der Agaroberfläche betrug in diesen Versuchen 6000 Lux.

B. Versuchsergebnisse.

1. Nährlösungskonzentration.

Entsprechend dem bekannten MITSCHERLICHschen Ertragsgesetz (vgl. PHEL, 1925 und 1931) sind die Gesamterträge (Zellenzahl je cmm \times v. Stoffproduktion in g/Trockengewicht) relativ um so günstiger, je niedriger die Ausgangskonzentration der Nährsalze gewählt wird (Tab. I, Sp. 2).

Tabelle I. *Nitzschia palea*, Planktische Massenkultur.
Zellerträge bei verschiedenen Nährlösungskonzentrationen.

Nährlösungskonzentration	Zellen im mm ³ (absolut)	Zellen im mm ³ (%)	Gesamtproduktion bei Zugrundelegung gleicher Nährstoffmengen
n	5200	100	100
n/2	3240	62	124
n/4	2480	48	192
n/8	1900	37	296
n/16	1550	30	480

³ Worauf die verschiedene Lage des Konzentrationsoptimums der Nährung in Agar- und Planktonkulturen zurückzuführen ist, läßt sich nicht mit Sicherheit angeben. Wahrscheinlich spielt die ungünstigere Verteilung der Diatomeenzellen selbst ausgeschiedenen Wachstumshemmstoffe (vgl. v. DENFFER, 1948), die sich vergleichsweise im Agar langsamer breiten als in der dauernd bewegten Nährlösung und dadurch in dieser relativ spät die toxische Wirksamkeitsgrenze überschreiten, hierbei eine Rolle.

Bei Zugrundelegung der „Normallösung“ und einer mittleren Zellgröße von etwa 28μ („Standardgröße“, vgl. Abschnitt B 9, S. 179): erhält man beispielsweise eine maximale Besiedlungsdichte von $5,2 \times 10^9$ Zellen im Liter, was einer Trockensubstanzmenge von etwa 0,98 g je Liter entspricht. Wird diese Normalkonzentration der Nährstoffe auf die

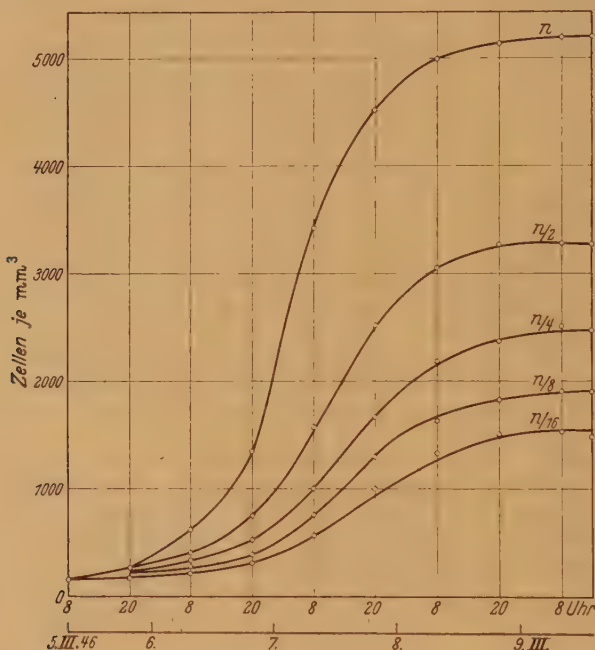


Abb. 2. *Nitzschia palea*, Planktonkultur. Wachstum bei verschiedenen Nährlösungskonzentrationen n = Normallösung. $n/2$, $n/4$, $n/8$ und $n/16$ = Verdünnungsstufen dieser Normallösung.

Hälfte verdünnt ($n/2$), so sinkt der Ertrag nicht etwa gleichfalls auf die Hälfte ab, sondern nur um etwa 38% auf 62% des Normalwertes. Bei Verdünnung der Nährlösung auf $n/4$ erhält man nicht 25%, sondern 48% des Normalertrages; bei $n/8$ nicht 12,5% sondern 37% und bei $n/16$ nicht 6,25, sondern 30%. Der bei Zugrundelegung gleicher Nährstoffmengen erreichbare Maximalertrag kann also durch die einfache Verteilung dieser Nährstoffmenge auf 16 verschiedene Kulturrohre auf annähernd das 5fache des Normalertrages gesteigert werden.

Es liegt zunächst nahe, die relativ schlechte Ausbeute bei den hohen Nährstoffkonzentrationen auf die steigende Lichtabsorption in den dichter bewachsenen Kulturrohren zurückzuführen. Tatsächlich nimmt die Lichtabsorption bald recht erhebliche Werte an. Während die frisch angesetzten Rohre, die eine schwach bräunlich-gelbe Farbe aufweisen, nur etwa 10% des eingestrahltten Lichtes absorbieren, nehmen die dicht bewachsenen Kulturrohre zum Schluß eine tief dunkelbraune Farbe an und eine dem Rohrdurchmesser entsprechende Schicht von 30 mm Stärke läßt auf dem statio-

nären Endzustand der Kultur an ihrer Rückseite nurmehr etwa 2,5% der eingestrahnten Lichtmenge wieder austreten.

Wie die in Abschnitt B 4 dargestellten Lichtintensitätsversuche zeigen, kommt jedoch dem Licht bei der planktischen Kultur offenbar keine derartige begrenzende Wirkung zu, denn die bei einer bestimmten Nährsalzkonzentration erreichte maximale Besiedlungsdichte erweist sich als weitgehend unabhängig von der Lichtintensität (Tab. III S. 171): Derselbe Endertrag wird mit anderen Worten bei niedrigerer Lichtintensität lediglich später erreicht als bei höherer. Offenbar kommen die einzelnen Zellen infolge der dauernden lebhaften Bewegung des Kulturmediums häufig und lange genug in den Bereich der höheren Lichtintensitäten, um eine begrenzende Wirkung des Lichtes auszuschließen.

Die schlechte Verwertung der höheren Nährstoffkonzentrationen muß daher einen anderen Grund haben. Man wird auch hier wieder in erster Linie an die bereits kurz erwähnten, von den Diatomeenzellen selbst ausgeschiedenen Autotoxine zu denken haben (vgl. Anm. 3 S. 163). Die Wirkung dieser Hemmstoffe wird zwangsläufig umso früher eintreten müssen, je kräftiger sich eine Kultur entwickelt, da die Erreichung der toxischen Grenzkonzentration unmittelbar von der Besiedlungsdichte abhängig ist.

2. Temperatur.

Das Temperaturoptimum des von mir isolierten *Nitzschia palea*-Klons liegt bei etwa 35° C. Selbst Temperaturen von über 40° (maximal 45° C) wurden jedoch vorübergehend (3 bis 4 Stunden) ohne merkliche Schädigung der Zellen ertragen. Wir haben es also mit einem an der oberen Grenze der mesophilen stehenden Organismen zu tun (vgl. RIPPEN-BALDES, 1947 S. 134).

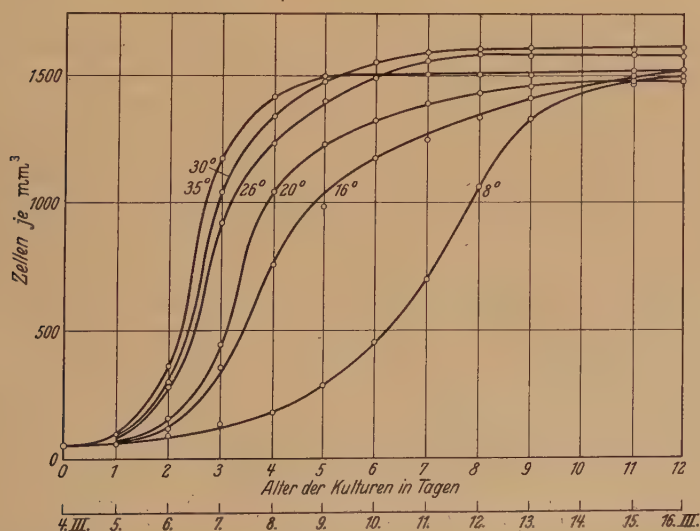


Abb. 3. *Nitzschia palea*, Streukulturen auf Mineralsalzagar. Populationsentwicklung bei 8°, 16°, 20°, 26°, 30° und 35° C. Optimale Entwicklungsgeschwindigkeit bei 35° C. Der Endertrag ist von der Temperatur unabhängig.

Diese für unsere einheimischen Diatomeenarten ungewöhnlich geringe Empfindlichkeit gegenüber relativ hohen Temperaturen hat übrigens zur Selektion der Art aus einem reichhaltigen Diatomeenrohmaterial geführt, das in zahlreichen Erd- und Schlammproben zur Prüfung auf seine Tauglichkeit für die planktische Massenkultur vorlag.

Mit Nährlösung aufgeschwemmte Proben sämtlicher Herkünfte wurden an verschiedenen extrem warmen Standorten im Institut und in den Gewächshäusern sich selbst überlassen. Die Temperatur im Inneren der Kolben wurde fortlaufend kontrolliert; sie stieg in den Mittagsstunden mehrerer aufeinanderfolgender Tage auf 43° bis 45° C an. *Nitzschia palea* war die einzige von insgesamt etwa 40 verschiedenen in den Proben enthaltenen Erd- und *Benthaldiatomeen* unserer Heimat, die diese Behandlung ohne Schaden zu nehmen überlebte.

Sicher darf diese extreme Unempfindlichkeit gegenüber hohen Temperaturen in erster Linie für die weite Verbreitung der Art verantwortlich gemacht werden; ermöglicht sie ihr doch selbst noch im Hochsommer — während fast alle übrigen einheimischen Diatomeenarten ein ausgesprochenes Entwicklungsminimum aufweisen und zum größten Teil praktisch vollständig aus unseren Gewässern verschwinden — ein ungestörtes Fortkommen.

Während die Entwicklungsgeschwindigkeit entsprechend der VAN T'HOFFSchen Regel erheblich von der Temperatur beeinflusst wird, bleibt die endgültig erreichte Besiedlungsdichte von ihr praktisch unbeeinflusst (Abbildung 3); bei Annäherung der Temperatur an den Optimalbereich wird also derselbe Endwert lediglich früher erreicht, als bei niedrigeren Temperaturen. RIPPELS Annahme, daß die Temperatur nicht unter die Ertragsfaktoren zu rechnen sei, trifft somit für *Nitzschia palea* ohne Einschränkung zu (vgl. RIPPel, 1931 S. 616, 1947 S. 143).

In Abbildung 4 ist die Abhängigkeit der Länge des Teilungsintervalls von der Temperatur für sechs verschiedene Temperaturstufen graphisch dargestellt⁴. Bei täglich 16-stündiger Belichtung mit 6000 Lux und einer „Standardgröße“ der Zellen von 28 μ errechnet sich die Generationsdauer bei 8° C auf etwa 44 Stunden, bei 16° C auf etwa 24,5 Stunden, bei 20° C auf etwa 21 Stunden, bei 26° C auf etwa 17 Stunden und bei 30° und 35° C auf etwa 16 Stunden. Der linke Teil der Kurve (8° bis 20° C) stimmt also recht gut mit der VAN T'HOFFSchen Regel überein (Temperatursteigerung um 10° C bewirkt ungefähr eine Verdoppelung der Reaktionsgeschwindigkeit), während sie sich in ihrem rechten Teil asymptotisch einem Grenzwert nähert, der optimalen Teilungsgeschwindigkeit, die auch bei der günstigsten Gestaltung aller Umweltfaktoren unter keinen Umständen unterschritten werden kann.

Neben der Generationsdauer sind in das gleiche Diagramm gestrichelt die von BARKER gemessenen Werte der assimilatorischen Leistung der *Nitzschia palea* bei verschiedenen Temperaturen eingetragen (BARKER, 1935 S. 147). Der Vergleich beider Kurven läßt

⁴ Sämtliche Werte beziehen sich ausschließlich auf den progressiven Entwicklungsabschnitt der Kultur (vgl. Abschnitt B 13: Bedingungen der Fettaufbildung).

die unmittelbare Beziehung, die zwischen Assimilation und Entwicklungsgeschwindigkeit besteht, deutlich erkennen. Ob oberhalb 35 ° C entsprechend der von BARKER beobachteten rapiden Abnahme der Assimilation allerdings auch eine entsprechende Verlängerung der Generationsdauer eintritt, konnte leider nicht ermittelt werden, da die Zellen bei den langfristigen Temperaturversuchen in den höheren Temperatur-

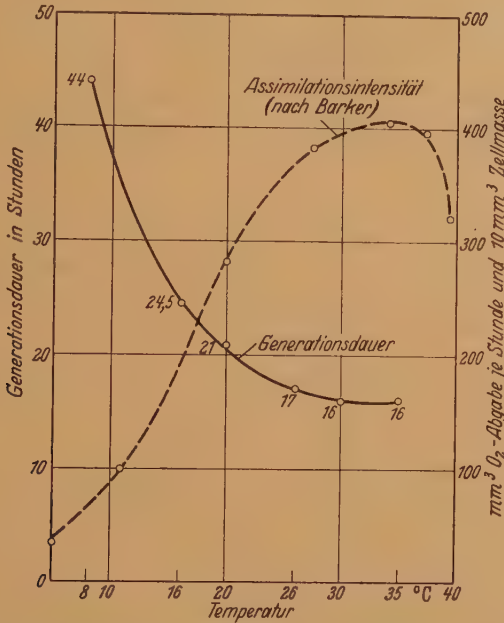


Abb. 4. *Nitzschia palea*, Streukulturen auf Mineralsalzagar. Abhängigkeit der Generationsdauer, von der Temperatur bei optimaler Gestaltung aller übrigen Faktoren. Zum Vergleich ist gestrichelt die Assimilationsintensität nach BARKER (1935) eingetragen.

stufen zugrunde gingen. Die gute Übereinstimmung der beiden Kurven innerhalb des Bereichs zwischen 10 ° und 35 ° C läßt sich jedoch deutlich erkennen, daß die Abkürzung der Generationsdauer bei ansteigender Temperatur im wesentlichen auf die Verbesserung der Assimilationsbedingungen und die damit verbundene beschleunigte Bereitstellung von Baumaterialien zurückzuführen sein dürfte.

Schon BARKER hat seinem Befund mit Recht eine ökologische Bedeutung für die Art beigemessen. Er vergleicht die Temperaturabhängigkeit der Assimilation von *Nitzschia palea* mit derjenigen der marinen *Nitzschia closterium* und schreibt: „*Nitzschia palea* is thus capable of withstanding high temperatures such as may occur in the soil or in small bodies of water. It is possible that the different temperature characteristics of the two diatoms may have ecological importance“, eine Annahme, die durch die vorliegenden Versuche über die Vermehrungsintensität, eine klare Bestätigung erfährt.

3. Einsaatdichte.

Im Gegensatz zu dem Verhalten anderer Organismen (wie z. B. der Hefe) ist bei *Nitzschia palea* auch die Einsaatdichte praktisch ohne Einfluß auf die endgültig erreichte Besiedlungsdichte der Kulturen. Es ist also ganz gleichgültig, ob man die Impfdichte so hoch bemißt, daß jede Zelle nur einen einzigen Teilungsschritt durchzumachen braucht, um die höchstmögliche Besiedlungsdichte der Kultur zu erreichen, oder ob man sie so niedrig wählt, daß der stationäre Endzustand erst nach Ablauf von zwanzig oder mehr Zellteilungen erreicht wird: in beiden Fällen ist der Endertrag annähernd gleichgroß.

In Abbildung 5 ist das Ergebnis eines Versuches wiedergegeben, bei dem die Einsaatdichte zwischen etwa $1/25$ und $1/2000$ des Endertrages variiert wurde:

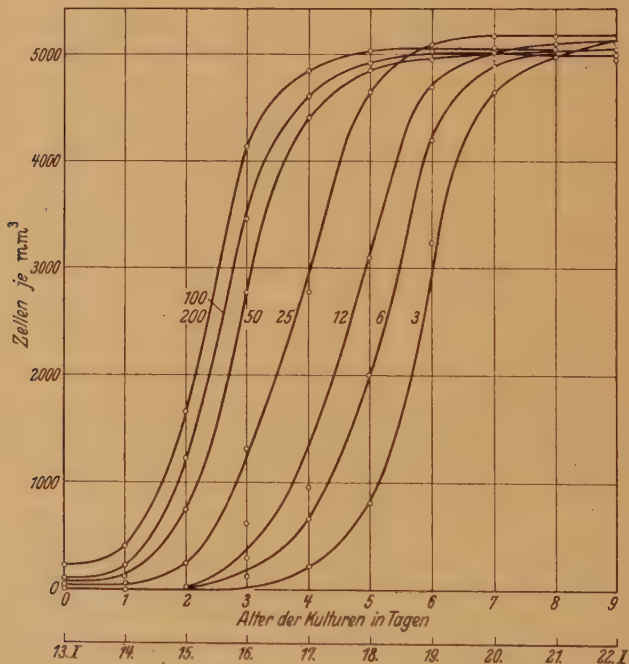


Abb. 5. *Nitzschia palea*, Planktonkultur. Populationsentwicklung bei verschiedener Einsaatdichte (3, 6, 12, 25, 50, 100 und 200 Zellen je mm³). Alle Kulturen erreichen etwa die gleiche Enddichte.

Die erste Serie wurde mit etwa 3 Zellen je mm³ der Kulturlösung beimpft, die zweite mit 6, die dritte mit 12, die vierte mit 25, die fünfte mit 50, die sechste mit 100 und die letzte mit 200. Die erste und die letzte Serie unterschieden sich also um sechs volle Teilungsschritte voneinander. Trotzdem erreichten alle 28 Rohre (der Versuch wurde mit vierfacher Wiederholung angesetzt) mit etwas über 5000 Zellen je mm³ praktisch die gleiche End-

dichte, die dem oben bereits erwähnten „Normalwert“ von $5,2 \cdot 10^9$ Zellen im Liter recht gut entspricht.

Eine ähnliche Unabhängigkeit des Ertrages von der Einsaatdichte hat ONDRATSCHEK bei dem heterotrophen Flagellaten *Chilomonas paramecium* feststellen können (ONDRATSCHEK, 1940).

4. Lichtintensität.

In Tabelle II ist die Abhängigkeit der Generationsdauer von der Lichtintensität für sieben verschiedene Beleuchtungsstärken zusammengestellt:

Tabelle II. *Nitzschia palea*, Planktische Kultur.
Generationsdauer bei verschiedenen Lichtintensitäten.

Lichtintensität in Lux	Generationsdauer in Stunden	Luxstunden
250	keine Zellteilungen	∞
500	103	51 500
1000	37	37 000
7000	13	91 000
10000	12,4	122 000
14000	12	168 000
20000	12	240 000

Die optimale Lichtintensität liegt für *Nitzschia palea* zwischen 7000 und 10000 Lux. Eine Steigerung über 10000 Lux hinaus führt zur Einstellung der für die Mehrzahl der pennaten Grund- und Bodendiatomeen charakteristischen Eigenbewegung. Sie hat daher zur Folge, daß die Zellen in Agar-Plattenkulturen zu langen *Fragilaria*-ähnlichen Zellbändern vereint bleiben. Eine nennenswerte Entwicklungsbeschleunigung wird bei Überschreitung dieses Grenzwertes nicht mehr erreicht (Tabelle III, Abbildung 6).

Unterhalb 7000 Lux wird das Licht für *Nitzschia palea*, bei optimaler Gestaltung aller übrigen Faktoren (Nährstoffkonzentration, CO_2 -Versorgung und Temperatur) bezüglich der Entwicklungsgeschwindigkeit zum begrenzenden Faktor; daß der endgültig erreichte Ertrag hiervon jedoch in weiteren Grenzen unberührt bleibt, wurde oben (Abschnitt B 1) bereits erwähnt. Wird der Wert von 200 Lux unterschritten, so finden keine Zellteilungen mehr statt. Schon unterhalb 500 Lux hat — genau wie bei überoptimaler Dosierung der Beleuchtungsstärke — auch jede Eigenbewegung der Zellen vollständig aufgehört, so daß in Agarkulturen wiederum die bereits beschriebenen *Fragilaria*-ähnlichen Zellbänder auftreten. Trotzdem wird selbst absolute Dunkelheit von den Zellen wochenlang ohne Schaden ertragen. Offenbar wird der gesamte Stoffwechsel im Dunkeln lediglich auf ein Minimum reduziert, so daß die an lebhaften Stoffwechselvorgänge geknüpften Bewegungsvorgänge zwangsläufig sistiert werden müssen.

In der gesamten Diatomeenliteratur wird immer wieder auf die große Empfindlichkeit dieser Algengruppe gegenüber höheren Licht-

intensitäten hingewiesen (vgl. z. B. MIQUEL zit. b. RICHTER, 1906 S. 103, HUSTEDT, 1930, GEITLER, 1932). Entgegen einer Angabe von RICHTER, nach der auch *Nitzschia palea* „starkem Licht nur einen geringen Widerstand zu leisten“ vermag, trifft diese Empfindlichkeit nach meinen Erfahrungen jedoch gerade auf diese Art nur sehr bedingt zu. Dauerbeleuchtung mit 20 000 Lux wird z. B. bei planktischer Kultur wochenlang ohne sichtbare Schädigung ertragen⁵). Das Wachstum war sogar bei dieser höchsten geprüften Lichtintensität gerade am günstigsten.

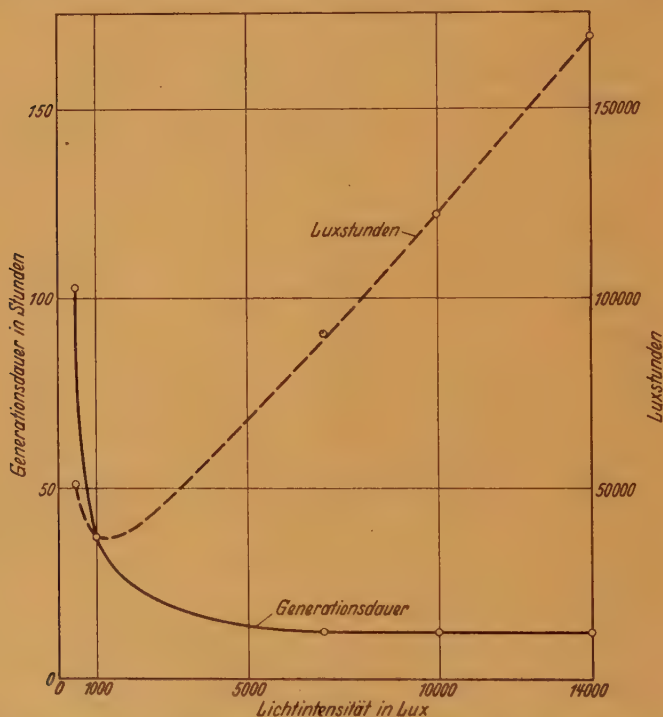


Abb. 6. *Nitzschia palea*, Planktonkultur. Abhängigkeit der Generationsdauer von der Lichtintensität bei optimaler Gestaltung aller übrigen Faktoren. Gestrichelt ist die zur Durchführung einer Zellteilung benötigte Luxstundenzahl eingetragen.

Es ist von Interesse, daß schon MIQUEL (zit. a. a. O. S. 103) festgestellt hat, daß die „kleine, gewöhnliche *Nitzschie*“, die sich fast an allen Orten vorfinde, sehr starke Beleuchtung vertrage, „sodaß man sie direkt zur Vorherrschaft bringen“ könne, wenn man die Kulturen „den stärksten Lichtstrahlen“ aussetze. Da mir leider die Originalarbeiten MIQUELS nicht zugänglich waren, vermag ich nicht zu entscheiden, ob sich dieses Zitat wohlmöglich auf *Nitzschia palea* selbst bezieht, was allerdings wenig wahrscheinlich ist, da RICHTER ja gerade bei dieser Art zu einem abweichenden Er-

⁵ Zum Vergleich sei daran erinnert, daß das Sonnenlicht in unseren Breiten auch unter den günstigsten atmosphärischen Bedingungen die Intensität von 80 000 Lux kaum jemals erreicht.

Tabelle III. *Nitzschia palea*, Planktische Kultur. Populationsentwicklung bei verschiedenen Lichtintensitäten (Individuenzahl im mm³). Das Wachstum ist bei 20 000, 14 000, 10 000 und 7 000 Lux annähernd gleich gut. Auch bei 1000 und 500 Lux wird trotz bedeutend verlangsamter Entwicklung nahezu die gleiche Enddichte erreicht, wie bei den höheren Intensitäten.

Alter der Kultur in Tagen:	20000 Lux	14000 Lux	10000 Lux	7000 Lux	1000 Lux	500 Lux
1	50	50	50	50	50	50
2	210	215	185	135	86	50
3	915	906	805	765	130	60
4	3680	3650	3455	2780	195	105
5	4630	4605	4576	4390	305	100
6	4870	4876	4870	4850	560	115
7	5115	5085	4978	4980	920	180
8	5100	5065	5160	4976	1520	186
9	—	—	—	4990	2580	210
10	—	—	—	5080	3550	380
11	—	—	—	5125	4110	410
12	—	—	—	5110	4530	400
13	—	—	—	—	4680	510
14	—	—	—	—	4700	910
17	—	—	—	—	—	1830
21	—	—	—	—	5035	2680
24	—	—	—	—	—	2950
29	—	—	—	—	—	3600
35	—	—	—	—	—	5010

gebnis kommt. Jedenfalls geht aber aus der Angabe hervor, daß schon früher in der unmittelbaren Verwandtschaft unserer Art ausgesprochene Starklichtformen beobachtet worden sind.

Niemals habe ich bei *Nitzschia palea* eine lichtbedingte Wachstumsremmung und Verfettung der Zellen beobachten können, wie sie nach GEITLER (1932, S. 16) bei *Navicula seminulum*, *Gomphonema parvulum*, *Eunotia formica* und *Eunotia pectinalis* var. *minor* im Gefolge intensiver Belichtung im Fenster oder an der künstlichen Sonne regelmäßig einzutreten pflegt. GEITLER führt diese Erscheinung auf eine Störung des richtigen Verhältnisses zwischen anorganischer und organischer Ernährung zurück. Die genannten Arten würden also nach seiner Ansicht bei höherer Lichtintensität in den „Diskordanzzustand“ geraten (vgl. Abschnitt B 13). Eine derartige unterschiedliche Wirkung des Lichtes auf Zellteilung und Assimilation konnte jedoch bei *Nitzschia palea* in dem untersuchten Intensitätsbereich bisher nicht nachgewiesen werden.

Direktes Sonnenlicht wirkt allerdings auch auf *Nitzschia palea* nach wenigen Minuten absolut tödlich. Ein Versuchsprotokoll vom 10. 7. 46 mag das erläutern:

10⁰⁰ h, wolkenloser Himmel, Lichtintensität etwa 65 000 Lux. Ein wassereukühles Esmarschälchen mit *Nitzschia palea* in Normalnährlösung wird ohne Deckel 5 min. lang dem direkten Sonnenlicht ausgesetzt. Temperatur der Nährlösung 22° C. Keine meßbare Temperatursteigerung während der

Insolation. Die Zellen sind in der Nährlösung so fein verteilt, daß kein Bodensatz entsteht und auch die Wärmeabsorption durch die Diatomeenzellen selbst zu keiner nennenswerten Temperaturerhöhung führen kann. Zur Kontrolle dient ein zweites, genau gleiches Esmarschschälchen, das jedoch unter einer Küvette steht, die 5 cm hoch mit Wasser gefüllt ist.

Ergebnis: sämtliche Zellen in der unbedeckten Schale unbeweglich, offensichtlich stark geschädigt. Plastiden bei über 90 % der Zellen entfärbt, bleich gelblich-grün, körnig, z. T. mit zahlreichen winzigen, zuvor unsichtbaren stark lichtbrechenden Fetttropfchen durchsetzt. Plastidenkonturen zerflossen. Plasmolyse negativ. Kulturversuch: keine Vermehrung. Nach 48 Stunden sämtliche Zellen eindeutig tot. — Kontrolle: sämtliche Zellen gesund und unverändert vermehrungsfähig.

Da die Temperatur während des ganzen Versuchs nicht über 22° gestiegen ist, läßt sich die Annahme MIQUELS, „daß die schädigende Wirkung der Sonnenstrahlen hauptsächlich auf der starken Erwärmung des Bodensatzes beruhe“ (zit. a. a. O. S. 103), der sich übrigens auch HUSTEDT (1930 a, S. 168) anschließt, für *Nitzschia palea* nicht aufrecht erhalten. Zumindest bei dieser Art dürfte die schädliche Wirkung des Sonnenlichts vielmehr auf den hohen Ultraviolettgehalt der Sonnenstrahlung zurückzuführen sein, denn schon eine kurzfristige Bestrahlung mit einer künstlichen UV-Quelle führt zu genau den gleichen Degenerationserscheinungen, wie eine entsprechende Insolation.

5. Verhalten gegenüber UV-Bestrahlung.

Die Bestrahlung erfolgte, genau wie bei den Insulationsversuchen, in wassergekühlten Esmarschschälchen. Als Lichtquelle diente eine künstliche Höhensonne (Quarzlampe Original Hanau, Modell SGW 500, 220 V, 550 Watt, 3,8 Amp.). Eine geringe Temperaturerhöhung der Nährlösung ließ sich bei den höchsten Bestrahlungsdichten nicht vermeiden. Der Wert von 25° C wurde jedoch in keinem Fall überschritten.

Bei einem Abstand von 40 cm von der UV-Quelle (Strahlungsintensität gemessen mit der Standard Photozelle nach Dr. LANGE: 7 000 Lux; vgl. die Kurve der spektralen Empfindlichkeit in B. LANGE: Die Photoelemente und ihre Anwendung, I und II, Berlin 1936 S. 76 f.) treten die ersten sichtbaren Anzeichen der Schädigung nach 20 bis 25 Minuten auf; verkleinert man den Abstand auf 15 cm (Strahlungsintensität s. o. 25 000 bis 30 000 Lux) genügt dagegen schon eine nur dreiminütige Bestrahlung, um sämtliche Zellen zu vernichten. Der Auszug aus einem Versuchsprotokoll soll den Verlauf eines derartigen UV-Versuchs verdeutlichen:

Bestrahlungsdichte 30 000 Lux, Abstand von der UV-Quelle 15 cm. Temperatur der Kultur bei Versuchsbeginn 22° C, nach 4 minütiger Bestrahlung 23,5° C. Wasserschicht über den Diatomeen etwa 2 mm.

- a) Ausgangsmaterial: Sämtliche Zellen lebhaft beweglich, gesund. Chromatophoren voll ausgebreitet, braungelb.
- b) 1 min. bestrahlt: wie a), ohne sichtbare Schäden. Lebhaft beweglich. Chromatophoren ausgebreitet, braungelb.
- c) 2 min. bestrahlt: nur noch etwa 40 % der Zellen beweglich. Plastiden der meisten Zellen leicht grünlich verfärbt, bei den unbeweglichen Zellen mit zerfließenden Konturen.

- d) 3 min. bestrahlt: nur innerhalb größerer Zellgruppen hier und dort noch einzelne schwach bewegliche Zellen. Rest unbeweglich. Plastiden in sämtlichen übrigen Zellen m. o. w. zerstört, Farbe grünlich, Konturen zerflossen.
- e) 4 min. bestrahlt: sämtliche Zellen tot. Plastiden bleich gelblich-grün, Struktur körnig, Konturen überall vollständig aufgelöst; Entmischung zahlreicher kleiner bis mittelgroßer Fetttröpfchen.

bleiben die Deckel der Esmarschschälchen geschlossen, so ist unter im Übrigen völlig gleichen Bedingungen selbst eine dreißigminütige Bestrahlung mit 30 000 Lux wirkungslos. Die UV-Absorption durch den Glasdeckel ist also groß genug, um die schädliche Wirkung der UV-Strahlung praktisch zu kompensieren. Diese Tatsache weist nochmals nachdrücklich darauf hin, daß die Schädigung bestimmt nicht auf die geringfügige Temperaturerhöhung zurückgeführt werden darf, die bei 4 minütiger Bestrahlung etwa 1,5° C ausmachte.

Unter natürlichen Bedingungen dürfte dem UV-Anteil des Sonnenlichtes allerdings für die Begrenzung der Biotope nur eine untergeordnete Bedeutung zukommen, da schon eine nur 20 cm starke Schicht belebten Wassers nach MERKER (1940) hinreicht, um praktisch das gesamte UV-Licht zu absorbieren. Es ist jedoch denkbar, daß die auffällige Beschränkung der *Nitzschia palea* auf tiefere Gewässer und ihr völliges Fehlen in seichten, langsam fließenden Bächen bzw. an sehr flachgründigen Ufern, mit ihrer hohen UV-Empfindlichkeit in ursächlichem Zusammenhang steht. Zur Entscheidung dieser Frage bedürfte es jedoch zunächst noch einer ausführlichen vergleichenden Untersuchung der UV-Empfindlichkeit der *Diatomeen*arten, die solche Standorte erwiesenermaßen bevorzugt besiedeln.

6. Lichtintensität und Massenproduktion.

Bemerkenswert sind die Beziehungen zwischen Lichtintensität und Massenproduktion. Die relative, zur Durchführung eines Teilungsschrittes aufgewendete Gesamtenergie ergibt sich aus dem Produkt: Lichtintensität \times benötigte Zeit (Luxstundenzahl; vgl. Tabelle II, rechte Spalte). Wie die graphische Darstellung Abbildung 6 lehrt, steigt dieser Wert oberhalb 1000 Lux annähernd linear an: die Energieverwertung wird also bei steigender Lichtintensität immer ungünstiger.

Die Erhöhung der Lichtintensität von 1000 auf 14000 Lux bewirkt z. B. eine Abkürzung des Teilungsintervalls auf etwa ein Drittel; gleichzeitig steigt aber die zur Durchführung der Teilung benötigte Luxstundenzahl trotz der zeitlichen Abkürzung auf mehr als das Vierfache an. Da auch bei Unterschreitung der 1000-Lux-Stufe eine Verschlechterung der Energieausbeute zu beobachten ist, kann der Intensitätsbereich um diesen Wert herum als energetisch optimal bezeichnet werden.

7. Die Zellteilungen erfolgen nur im Licht.

Neue Zellteilungen werden von den gefärbten Diatomeenarten nur im Licht eingeleitet. Wie seit langem bekannt ist, finden daher im Dunkeln normalerweise keine Zellteilungen statt, (vgl. z. B. RICHTER

1906 S. 100 f., HUSTEDT, 1930 S. 168⁶). Im Licht bereits eingeleitete Zellteilungen werden jedoch auch in darauf folgender Dunkelheit zu Ende geführt.

Hält man daher eine *Nitzschia palea*-Kultur acht bis zehn Tage lang dunkel, so kann man auf diese Weise ein physiologisch relativ einheitliches Zellmaterial gewinnen, in dem sich keine frisch eingeleiteten Zellteilungen mehr befinden. Das hat zur Folge, daß die Zellteilungen in einer derartigen Kultur nach erneuter Belichtung zunächst eine Zeit lang annähernd synchron ablaufen.

Sehr deutlich geht das aus der graphischen Darstellung Abbildung 7 hervor. Auf der Abscisse ist die Zeit — vom Beginn der Wiederbelich-

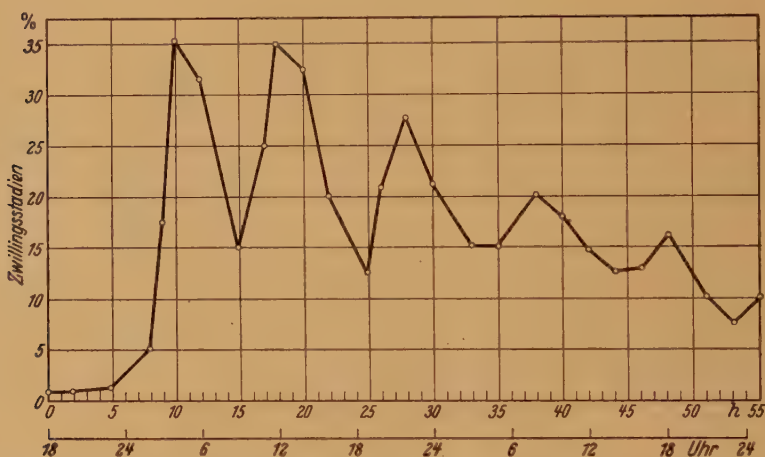


Abb. 7. *Nitzschia palea*, Planktonkultur (Größe der Zellen 18 bis 22 μ). Teilungsrhythmik nach vor-
aufgehender zehntägiger Verdunkelung. Die Zellteilungen (charakterisiert durch den Prozentsatz
der „Zwillingsstadien“ in der Kultur) wiederholen sich periodisch in etwa zehnstündigen Ab-
ständen. Da sich das Material aus verschiedenen Größenklassen zusammensetzt, klingt die Rhythmik
jedoch allmählich ab und ein Gleichgewicht mit andauernd etwa 6 Teilungsprozenten spielt sich ein.

tung an — aufgetragen und auf der Ordinate ist in kurzfristigen Zeit-
abständen der jeweilige prozentuale Anteil der „Zwillingsstadien“
angegeben, die sich zu den angegebenen Zeiten in der Kultur befanden.
Unter „Zwillingsstadien“ werden dabei alle jene Zellteilungsstadien
zusammengefaßt, in denen die beiden neugebildeten Tochterzellen be-
reits deutlich voneinander abgesetzt, aber noch nicht endgültig von-
einander getrennt waren (späte Anaphase bis späte Telophase). Im
Ausgangsmaterial waren diese „Zwillingsstadien“ mit etwa 0,8% prak-
tisch fast ganz verschwunden. Schon nach achtestündiger Belichtung
stieg jedoch ihr Prozentsatz mit 5% deutlich an, um nach neun Stunden

⁶ Verfettete Zellen verhalten sich allerdings in dieser Hinsicht anders,
worauf weiter unten (Abschnitt B 11) zurückzukommen sein wird.

18% und nach zehn Stunden 35% zu erreichen. Mit diesem Wert war das erste Teilungsmaximum erreicht und die Anzahl der Zwillingsgruppen nahm in den folgenden Stunden erheblich wieder ab (nach 15 Stunden fanden sich nurmehr 15% in der Kultur), um erst nach weiteren acht bis zehn Stunden mit abermals 35% ein zweites Maximum zu erreichen. Trotzdem sich in einer natürlichen, aus verschiedenen Größenklassen zusammengesetzten Population eine absolute Synchronisierung sämtlicher Zellteilungen aus sogleich noch näher zu erörternden Gründen nicht erreichen läßt, erkennt man, daß die Synchronisation erst am zweiten Tage allmählich ausklingt, und einem ausgeglichenen Endzustand zustrebt, in dem sich dauernd etwa 6% der Zellen in Teilung befinden.

An Stelle der gewöhnlichen S-förmigen Populationswachstumskurven (Abbildung 2, 3 und 5) erhält man daher bei Verwendung von Impfmaterial, das zuvor längere Zeit verdunkelt war, treppenförmige Wachstumskurven, bei denen jede folgende Stufe etwa doppelt so hoch ist, wie die ihr voraufgehende. Normalerweise pflegen sich allerdings diese Stufen mit der Teilungsrhythmik bereits nach wenigen Tagen weitgehend wieder zu verwischen. Durch die Einschlebung regelmäßiger Dunkelperioden läßt sich aber die Rhythmik leicht von Außen „steuern“; bei einem 6:6 Stunden Licht-Dunkel-Rhythmus und einer Beleuchtungsstärke von 10000 Lux wird beispielsweise nur in jeder zweiten Beleuchtungsperiode eine neue Zellteilung eingeleitet, die so-

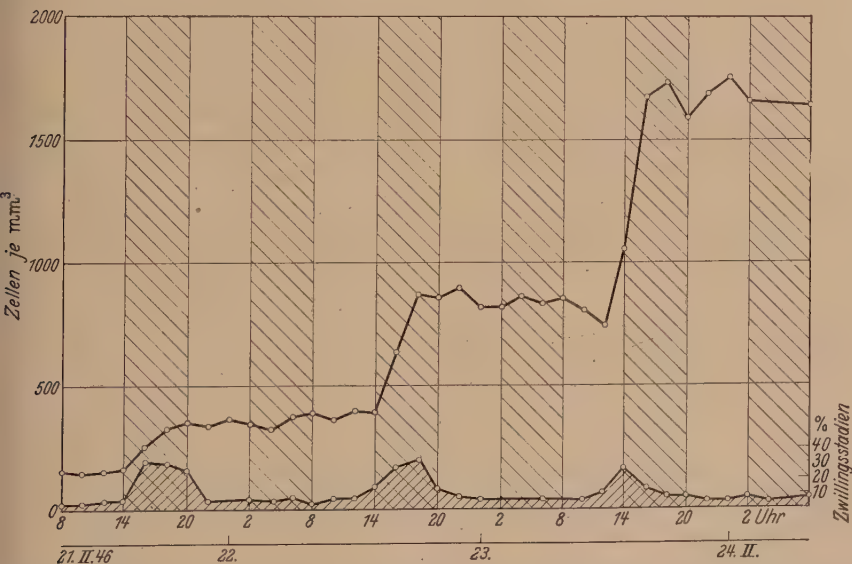


Abb. 8 *Nitzschia palea*, Planktonkultur. Populationsentwicklung in einer von 6 zu 6 Stunden periodisch verdunkelten Kultur nach voraufgehender achttägiger Verdunkelung. Die Zellteilungen wiederholen sich rhythmisch in jeder zweiten Dunkelperiode. Untere Kurve: Prozentualer Anteil der Zwillingsstadien; obere Kurve: absolute Zelldichte im mm^3

dann in der darauf folgenden Dunkelperiode endgültig zu Ende geführt wird (Abbildung 8) ⁷.

Im Anschluß an eine längere vorausgehende Dunkelperiode wird also der Diatomeenkultur mit dem erneuten Einsatz der Belichtung ein Zellteilungsrhythmus aufgeprägt, der trotz völlig konstanter Außenbedingungen sozusagen „endonom“ eine Zeit lang weitergeführt wird.

Die Deutung dieser rhythmischen mitotischen Aktivität bereitet keine Schwierigkeiten: Zur Durchführung eines jeden Teilungsschrittes muß zunächst ein bestimmtes Quantum an Baumaterial bereitgestellt werden. Dieses Baumaterial wird aber zum überwiegenden Teil auf dem Wege der Photosynthese gewonnen. Während der Dunkelperiode sind alle noch vorhandenen Assimilatreserven aufgezehrt worden, so daß beim Einsatz der neuen Belichtung sämtliche Zellen etwa den gleichen „Start“ haben. Sie werden daher auch alle etwa zur gleichen Zeit den kritischen Sättigungsgrad mit Assimilaten erreichen, der die Voraussetzung für die Einleitung einer neuen Zellteilung darstellt. Bei dieser Teilung werden sodann die Reserven abermals aufgezehrt und das Spiel beginnt von neuem.



Man kann sich den skizzierten Ablauf des Teilungsvorganges vielleicht am besten am Modell eines periodisch entleerten Wasserbehälters mit Überlaufheber klarmachen (Abbildung 9). In die Seitenwand des Behälters H (Diatomeenzelle), der aus einer Zuflußleitung Z langsam mit einem konstanten Wasserstrom aufgefüllt wird (Assimilate-Anreicherung) ist ein Heber eingebaut, der beim Überschreiten einer gewissen Wasserhöhe anspricht und in kurzer Zeit zur vollständigen Entleerung des Behälters führt (Zellteilungsvorgang). Das langsam zuströmende Wasser füllt darauf den Behälter von neuem an usw. (Prinzip des Soxhlet-Apparates) ⁸. Die Physiker bezeichnen derartige selbstgesteuerte rhythmische Vorgänge, bei denen die in der Entladung eines Energiespeichers abgegebene Energie nicht in den Speicher zurückkehrt, als Kipperschwingungen. Wir haben die in Abbildung 9

Abb. 9. Periodisch entleerter Wasserbehälter mit Überlaufheber als Modell für die endonome Zellteilungsrythmik autotropher einzelliger Organismen, bei konstanten Außenbedingungen (nähere Erläuterung im Text).

wiedergegebene Apparatur mit gutem Erfolg dazu verwendet, um die Nährlösung in Diatomeenkulturen mit Glaswolle als Substrat ohne besondere Wartung in regelmäßigen Zeitabständen zu erneuern.

⁷ Auf eine derartige „Steuerung“ durch den normalen Tagesrhythmus dürfte sich wahrscheinlich auch das periodisch — zumeist in den Abendstunden bis gegen Mitternacht — gehäufte Auftreten der Zellteilungen bei zahlreichen anderen darauf hin untersuchten Süßwasseralgen zurückführen lassen (vgl. z. B. Tabul. Biol. Suppl. I (Bd. V), 1929, 497/98).

⁸ Prinzipiell die gleiche endonome Rhythmik gilt übrigens auch für das Blühen vieler unserer Waldbäume, das ja bekanntlich bei zahlreichen Arten nicht alljährlich, sondern in größeren Zeitabständen im Rhythmus der sogenannten „Mastjahre“ erfolgt. Auch in diesem Falle muß der Assimilatspiegel jedesmal erst wieder bis zu einem bestimmten Mindestwert aufgefüllt werden, ehe eine neue Blühpériode eingeschaltet wird.

8. Teilungsintervall und Größenklassen.

Das geschilderte Kippschwingungsmodell ist gleichzeitig geeignet, die Beziehungen zwischen Zellgröße und Generationsdauer verständlich zu machen: bei konstantem Zufluß muß das Intervall zwischen den einzelnen Entleerungen zwangsläufig umso größer werden, je größer der Behälter H — das heißt also je größer die Diatomeenzelle — ist. Große Zellen müßten dementsprechend — gleiche assimilatorische Leistung vorausgesetzt — ein längeres Teilungsintervall aufweisen als kleine⁹. Das ist nun entgegen der bei anderen Diatomeenarten gemachten Erfahrung bei *Nitzschia palea* tatsächlich der Fall.

Bei fortlaufend simultaner Teilung sämtlicher von einer Mutterzelle ausgehenden Individuen und kontinuierlicher Größenabnahme der Tochterindividuen um jeweils die doppelte Schalendicke, müßte man bei Zugrundelegung der MAC-DONALD-PFITZERSchen Regel eine binomiale Verteilung der Zellen auf die einzelnen Größenklassen erwarten. Untersucht man jedoch daraufhin eine ältere Klonkultur variationsstatistisch, so stellt man fest, daß die tatsächliche Verteilung dieser Erwartung keineswegs entspricht (Abbildung 10, ausgezogene Kurve). Man beobachtet vielmehr regelmäßig eine deutlich asymmetrische Verteilungskurve mit auffällig überhöhtem und stark nach rechts (in Richtung auf die größeren Individuen) verschobenem Gipfel.

Aus dieser Verteilungskurve läßt sich unmittelbar zweierlei ablesen: Erstens befinden sich die Individuen mit überdurchschnittlicher Größe in der relativen Überzahl, und zweitens deutet die auffällige Überhöhung des Gipfels auf eine starke Tendenz zur Erhaltung eines ganz bestimmten Größenwertes hin, der in dem dargestellten Fall bei 28μ („Standardgröße“) liegt. Bei Populationen mit einer wesentlich geringeren Durchschnittsgröße kann dieser Gipfel auf entsprechend niedrigere Werte fallen; stets sind jedoch Rechtsverschiebung und Überhöhung gleich deutlich zu erkennen, wie in dem wiedergegebenen Beispiel.

Die Rechtsverschiebung des Verteilungsmaximums kann theoretisch zwei verschiedene Gründe haben: Entweder vollzieht sich die absolute Größen-

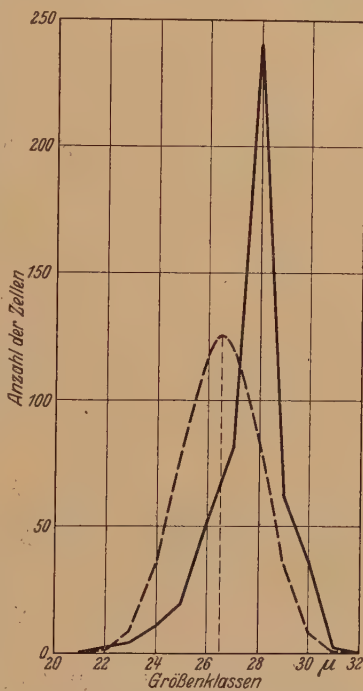


Abb. 10. *Nitzschia palea*, Planktonkultur. Typische Größenverteilung von 500 Zellen. Stark überhöhter und nach rechts verschobener Gipfel der Verteilungskurve. (Zum Vergleich ist gestrichelt die theoretisch zu erwartende binomiale Größenverteilung eingetragen).

⁹ Die Chromatophorengrößen der Auxosporen und der herabgeteilten Individuen unterscheiden sich nur ganz unerheblich voneinander.

abnahme der Tochterzellen nicht kontinuierlich, sondern nimmt mit der Verkleinerung der Zellen immer größere Werte an, oder aber die Teilungsfrequenz der kleinen Zellen muß höher sein, als bei den großen Zellen. Die erste Möglichkeit hat offenbar von vornherein nur wenig Wahrscheinlichkeit für sich; eher könnte man umgekehrt erwarten, daß die Wanddicke eine bestimmte Relation zur Zellgröße einhält und daß dementsprechend die absolute Größenabnahme der Zellen bei ihrer Verkleinerung allmählich immer geringer wird (vgl. HUSTEDT, 1930 a S. 37; GEITLER, 1932 S. 8/9).

So bleibt also nur die zweite der erwähnten Deutungsmöglichkeiten übrig: erhöhte Teilungsfrequenz bei verminderter Zellgröße, und das Experiment hat diese im ersten Augenblick überraschende, weil allen bisherigen Erfahrungen bei anderen Diatomeen widersprechende Deutung tatsächlich bestätigt. (vgl. z. B. MÜLLER, 1883; HUSTEDT, 1930 a, S. 94).

Kombiniert man nämlich beim Ansatz einer neuen Kultur das Impfmateriale aus 50% Zellen einer großzelligen Kultur (Auxosporenmaterial mit einer Durchschnittsgröße von 30 bis 34 μ) mit 50% Zellen einer kleinzelligen Kultur des gleichen Klonen (20 bis 24 μ), die man durch geeignete Behandlung an der Auxosporenbildung gehindert hat, so kann man unmittelbar verfolgen, wie die großen Zellen in ihrer Vermehrung von den kleinen überflügelt werden und auf dem stationären Endzustand erheblich zurückgedrängt erscheinen (unter 1945 gemessenen Zellen fanden sich z. B. in einem derartigen Versuch nach 6 Tagen neben 1441 kleinen Zellen nur 504 große, das sind knapp 26%). Geht man von verdunkeltem Material aus, in dem sich keine Zellteilungsstadien mehr befinden, und zählt man sodann in regelmäßigen Zeitabständen den prozentualen Anteil der großen und der kleinen Zellen unter den „Zwillingsstadien“ aus, so zeigt sich, daß die ersten Zellteilungen fast ausschließlich von den kleinen Individuen gestellt werden (nach 9 Stunden findet man etwa 95% kleine Zellen neben nur 5% Auxosporen in Teilung), während der Prozentsatz der „großen“ nur ganz allmählich ansteigt und erst nach etwa 30 Stunden mit etwa 42% sein Maximum erreicht.

Aus einer größeren Reihe derartiger Versuche lassen sich für die verschiedenen Größenklassen der *Nitzschia palea* unter optimalen Wachstumsbedingungen folgende Generationsdauern ableiten: Auxosporen (30 bis 32 μ) 20–24 Stunden; mittelgroße Zellen („Standardgröße“ 28 μ) 16–20 Stunden; kleine Zellen (18 bis 20 μ) 10–12 Stunden.

9. Sekundäres Längenwachstum.

Aber auch noch ein zweiter Faktor scheint bei der besprochenen Rechtsverschiebung des Verteilungsmaximums eine Rolle zu spielen. Es hat sich nämlich gezeigt, daß selbst in lebhafter Entwicklung befindliche Planktonkulturen trotz regelmäßiger Zellteilungen bei konstanten Außenbedingungen monatelang die gleiche statistische Zusammensetzung bewahren, während sich doch nach der MAC-DONALD-PFITZERschen Regel das Größenmaximum allmählich in der Richtung auf die kleineren Individuen verlagern müßte. In Tabelle IV sind die regelmäßigen variationsstatistischen Analysen eines Klonen während der Dauer eines Jahres zusammengestellt. Trotzdem die Zellen zwischen der ersten und der letzten Messung größenordnungsmäßig rund 300 Teilungen durchgemacht haben, ist praktisch keine Größenabnahme des Mittelwertes festzustellen.

Tabelle IV. *Nitzschia palea*, Planktische Massenkultur. Variationsstatistische Analyse eines regelmäßig überimpften Klones während eines Jahres. Trotzdem die Zellen in der Zeit zwischen der ersten und der letzten Messung etwa 300 Zellteilungen durchgemacht haben, ist praktisch keine Größenabnahme des Mittelwertes festzustellen.

Datum der Messung	Verteilung auf die einzelnen Größenklassen in % (Größenklassen in μ)											Mittel
	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	
24. 5. 46	—	1	1	2	8	17	33	24	9	5	—	28,09
8. 8. 46	1	1	2	3	6	14	35	27	10	1	—	27,96
5. 11. 46	1	—	2	4	7	16	36	24	10	1	—	27,88
24. 2. 47	1	1	2	4	6	16	37	26	7	—	—	27,81
24. 5. 47	1	—	2	3	8	15	37	26	8	—	—	27,88

Diese Erscheinung kann nur dadurch erklärt werden, daß die *Nitzschia palea*-Zellen die Fähigkeit besitzen sekundär in die Länge zu wachsen und auf diese Weise die durch den eigenartigen Zellteilungsmechanismus der Kieselalgen zwangsläufig eintretende Zellverkleinerung auch ohne Auxosporenbildung wieder auszugleichen. Unter optimalen Kulturbedingungen liegt die angestrebte mittlere Größe der Zellen bei etwa 28 μ . Ich habe diesen Wert, der sich im Laufe der Zeit selbständig in allen normal belichteten und ernährten Planktonkulturen einstellt und sodann durch viele Generationen ohne die Einschaltung von Auxosporen unverändert beibehalten wird, als „Standardgröße“ bezeichnet. Unter ungünstigen Kulturbedingungen (schlechtes Licht, niedrige Temperatur, mangelhafte Durchlüftung) kann das Größenmaximum jedoch auch auf erheblich niedrigere Werte fallen (Abbildung 11).

Geht man von einer Kultur frisch herangewachsener Auxosporen mit einer mittleren Größe von 30 bis 32 μ aus, so beobachtet man in den ersten Wochen eine deutliche Abnahme der mittleren Zellgröße. Sie beläuft sich — wie man an den „Zwillingsstadien“ unmittelbar beobachten kann — auf größenordnungsmäßig etwa 0,05 μ je Zellteilung, weil jeweils die eine der beiden aus derselben Teilung hervorgehenden Schwesterzellen um rund 0,1 μ kleiner zu sein pflegt, als die Ausgangszelle. Durch die mit der Zellverkleinerung verbundene Abkürzung der Generationsdauer erfährt die Verteilungskurve zugleich ihre charakteristische Ausweitung nach links. Ist auf diese Weise die mittlere Zellgröße im Laufe von 40 bis 80 Zellteilungen auf die „Standardgröße“ von 28 μ abgesunken, so ist damit unter günstigen Kulturbedingungen das „Stadium mit konstanter Apikallänge“ erreicht, d. h. das sekundäre Längenwachstum wirkt allen weiteren Zellverkleinerungen so wirksam entgegen, daß sie sich auf das Ganze gesehen nicht weiter bemerkbar machen. Je ungünstiger die Kulturbedingungen sind, desto später wird offenbar dieses Stadium mit konstanter Apikallänge erreicht. Daher ist es möglich, daß sich in den schlecht durchlüfteten und beleuchteten „Glaswollekulturen“ im Laufe der Zeit trotz ungünstigerer Zell-

teilungsbedingungen eine geringere Durchschnittsgröße einstellt, als in regelmäßig überimpften, üppig wachsenden Planktonkulturen des gleichen Klon, die auf die gleiche Ausgangskultur zurückgehen.

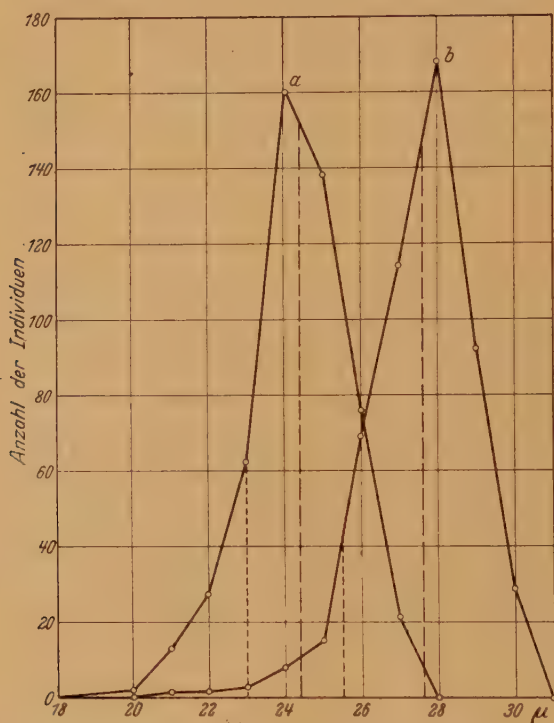


Abb. 11. *Nitzschia palea*, Größenverteilung ein und derselben Population: a) am 16. Juli im Glaswollekolben, b) zwei Monate später nach Übertragung in ein Planktonkulturrohr. Sekundäres Größenwachstum ohne Auxosporenbildung.

Überimpft man Zellmaterial aus einer derartigen kleinzelligen Glaswollekultur in ein Planktonrohr und verfolgt nun die Durchschnittsgröße der Zellen unter den neuen, günstigeren Lebensbedingungen, so kann man ohne die Einschaltung einer Auxosporenbildung einen allmählichen Wiederanstieg des Größenmittels beobachten (Tabelle V). Auf diese Weise läßt sich das sekundäre Größenwachstum der Zellen unmittelbar statistisch nachweisen. Der Versuch gelingt allerdings nur, wenn man durch regelmäßige Übertragung in frische Nährlösung dafür sorgt, daß sich die Zellen lebhaft zu teilen vermögen; unter ungünstigen Wachstumsbedingungen der Kulturen (Hemmstoffanreicherung, Verfettung der Zellen) unterbleibt auch das sekundäre Längenwachstum der Einzelzellen. Es erscheint daher fast so, als ob eine unmittelbare Beziehung zwischen Zellteilungsvorgang und sekundärem Membranwachstum bestehen würde. Vielleicht befindet sich die Membran gerade zur Zeit

Tabelle V. *Nitzschia palea*, Variationsstatistische Analyse ein und derselben Population: a) am 26. Juli 1945. b) zwei Monate später nach Übertragung in ein Planktonrohr. Sekundäres Längenwachstum ohne dazwischengeschaltete Auxosporenbildung.

Datum der Messung	Verteilung auf die einzelnen Größenklassen in % (Größenklassen in μ)													Mittel
	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	
16. 7. 45	—	1	2	13	27	62	160	138	76	21	—	—	—	24,37
16. 9. 45	—	—	—	1	1	3	8	15	69	114	168	92	29	27,56

der Mitose unter der Einwirkung spezifischer nur während dieses Entwicklungsabschnittes vorhandener Stoffe in einem besonders stark aufgelockerten, plastischen Zustand.

Es sei in diesem Zusammenhang darauf hingewiesen, daß bereits im Jahre 1942 eine kurze Notiz von STEN WIEDLING erschienen ist, nach der auch dieser Autor bei verschiedenen *Nitzschien* in mehrjährigen Versuchsreihen keine Größenabnahme der durchschnittlichen Apikallänge der Zellen hat feststellen können. Ferner verdient eine auffällige Beobachtung GISTL's erwähnt zu werden, der bei mehreren Erddiatomeen (darunter u. a. bei der mit *Nitzschia palea* nahe verwandten *Hantzschia amphioxus*) unter verschiedenen Kulturbedingungen erheblich voneinander abweichende Größenmittelwerte feststellen konnte. Unter bestimmten Kulturbedingungen trat zwar auch Auxosporenbildung ein, aber GISTL schreibt ausdrücklich: „Damit allein lassen sich die Größenunterschiede nicht erklären. Es spielen wohl Quellungs- und Entquellungserscheinungen eine Rolle, bedingt durch die Veränderung der kolloidalen Struktur der Zellen und den Einfluß des jeweiligen Ionenmisches, das auf die Kieselalge wirkt.“

Es darf daher m. E. als eindeutig erwiesen betrachtet werden, daß einige Diatomeenarten, darunter vor allem die eingehend untersuchte *Nitzschia palea*, tatsächlich die Fähigkeit zu sekundärem Längenwachstum besitzen. Damit wird gleichzeitig die regelmäßig beobachtete starke Überhöhung des Gipfels der Variationskurven verständlich, die offenbar dadurch zustande kommt, daß ein ganz bestimmter Größenwert, der seinerseits von den Umweltbedingungen abhängig ist, von allen kleineren Zellen der Kultur aktiv angestrebt wird, — eine bei anderen Algen durchaus geläufige, bei den Diatomeen jedoch grundsätzlich neuartige und im ersten Augenblick recht unwahrscheinlich anmutende Erscheinung (vgl. HUSTEDT, 1930 b, S. 30). Setzt sie doch voraus, daß die Zellmembran der in Frage kommenden Arten nicht starr und fest sein kann, sondern vielmehr plastisch und dehnbar sein muß.

Tatsächlich läßt sich das bei *Nitzschia palea* auch schon aus gewissen direkten Beobachtungen schließen. Es wurde bereits (Abschnitt B 4) erwähnt, daß die Zellen unterhalb einer Lichtintensität von etwa 500 Lux unbeweglich sind und infolgedessen bei den Zellteilungen nicht auseinanderkriechen können, so daß in derartigen Kulturen im Laufe der Zeit lange *Fragilaria*-ähnliche Zellbänder auftreten. Nun sind die beiden Valvae der einzelnen Zellen nicht genau planparallel, sondern in Richtung auf die Zellpole schwach gegeneinander geneigt. Bleiben daher die Schalen der Tochterzellen mit ihren Oberflächen fest aneinander haften, wie das aus noch unbe-

kannten Gründen häufig der Fall ist, so erfahren die beiden äußersten Schalenhälften der Ursprungszelle des ganzen Zellbandes nebst ihren unmittelbar benachbarten Abkömmlingen eine im Laufe der Zeit immer auffälliger werdende Krümmung, der sie natürlich nur nachzukommen vermögen, wenn sie nicht starr und spröde, sondern plastisch deformier- und dehnbar sind (Abbildung 12). Da stets gerade die beiden ältesten Schalenhälften des ganzen Bandes die stärkste Deformation erleiden, kann die geschilderte Erscheinung mit den mannigfaltigen Degenerations- und Involutionsformen, die zuweilen in älteren Agarkulturen in großer Menge zu finden sind, offenbar nichts zu tun haben.

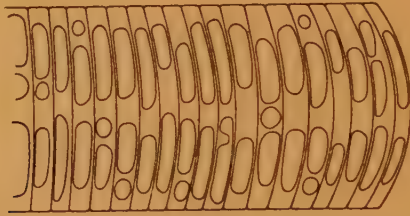


Abb. 12. *Nitzschia palea*. Ende eines Zellbandes aus einer Agarkultur, die bei 300 Lux gehalten wurde. Starke plastische Schalendeformation der Endzellen. (Nach einer mit dem Zeichenapparat hergestellten Umrisszeichnung; Vergrößerung 1000 fach).

Eine ähnliche plastische Schalendeformation läßt sich gelegentlich auch in sehr dicht besiedelten Agarkulturen auf besonders steif gekochtem Agar beobachten. Unter diesen Umständen vermögen die Zellen nicht in das Agar einzudringen und bedecken schließlich die Agaroberfläche so dicht, daß sie sich gegenseitig bedrängen und ineinanderschieben. Dabei kommt es häufig ebenfalls zu erheblichen Deformationen und Verbiegungen der Membranen.

Befreit man die Zellen aus ihrer Zwangslage oder zertrümmert man die zuvor geschilderten deformierten Zellbänder, so behalten die einzelnen herausgelösten Zellen ihre verbogene Gestalt auch weiterhin bei; die Membran ist also nicht elastisch, sondern vielmehr plastisch deformiert worden. Eine derartige Plastizität ist natürlich nur denkbar, wenn ihre Verkieselung sehr schwach ist. Man wird daher der *Nitzschia palea*-Membran eine Feinstruktur zuschreiben müssen, die Zeit ihres Lebens nicht über den Härtegrad des Perizoniums anderer pennater Diatomeenarten hinausgeht, das ja, wie wir wissen, gleichfalls bis zu einem gewissen, allerdings stets nur sehr geringen Grade mit Silikat inkrustiert zu sein pflegt und dennoch dem häufig mächtigen Größenwachstum der Auxosporen nachzugeben vermag. Für die schwache Verkieselung der *Nitzschieen*-Membran spricht übrigens auch schon die Tatsache, daß die Schalen der mit *Nitzschia palea* nahe verwandten *Nitzschia acicularis* nach einer Angabe von HUSTEDT durch starke Säurebehandlung meistens zerstört werden (1930 a. S. 423/424)¹⁰.

¹⁰) Erst nach dem Abschluß des Manuskriptes erreichte mich die soeben publizierte neueste Arbeit von STEN WIEDLING, in der er das Belegmaterial für die in der oben zitierten Arbeit gemachten Angaben vorlegt. (Botaniska Notiser 1948, Heft 3, S. 322—354). Es erweist sich, daß sich unsere Erfahrungen auf das Beste ergänzen. Da WIEDLING ausschließlich mit sehr

10. Mitosedauer.

Vorausgesetzt, daß die Generationsdauer eines Organismus bekannt ist, läßt sich aus dem prozentualen Anteil der einzelnen Zellteilungsstadien unschwer auf statistischem Wege auch die Mitosedauer bestimmen. Die Generationsdauer von *Nitzschia palea*-Zellen der „Standardgröße“ (28μ) beläuft sich wie schon erwähnt auf etwa 16 bis 18 Stunden. Unter optimalen Entwicklungsbedingungen findet man in einer derartigen Kultur neben rund 90% Ruhekernen etwa 3% Prophasen, je etwa 0,5% Metaphasen und Anaphasen, sowie etwa 2% frühe und 4% späte Telophasen. Diese 6% Telophasen entsprechen im wesentlichen den Entwicklungsstadien, die sich schon ohne besondere Färbung als „Zwillingsstadien“ erkennen lassen. Setzt man die Generationsdauer (960' bis 1080') der Einfachheit halber mit durchschnittlich 1000' an, so ergeben sich daraus für die einzelnen Mitoseabschnitte folgende Zeiten: Interkinese: 15 Stunden; Prophase 30'; Metaphase und Anaphase je 5'; frühe Telophase 20' und späte Telophase 40' (Gesamtdauer des Zwillingsstadiums also etwa eine 1 Stunde). Die beobachteten Zeiten lassen sich größenordnungsmäßig durchaus mit den bei höheren Pflanzen gefundenen Werten vergleichen: Der gesamte Teilungsvorgang läuft in etwa $1\frac{3}{4}$ Stunden ab, ihm folgt eine etwa 15stündige Ruhe-

langsam wachsenden Agarkulturen gearbeitet hat, erstreckt sich bei ihm die Größenabnahme der verschiedenen geprüften *Nitzschia*-Arten in allen Fällen über erheblich längere Zeiträume, als in meinen schnellwüchsigen Planktonkulturen. Leider macht er keine genaueren Angaben über die Generationsdauern in seinen Kulturen, sodaß ein unmittelbarer Vergleich der Ergebnisse auf Schwierigkeiten stößt. Dennoch möchte ich auf einige mir wichtig erscheinende Punkte kurz hinweisen.

Bei einigen Stämmen von *Nitzschia Kützingiana* hat WIEDLING in seinen Kulturen genau die gleichen bandförmigen Zellaggregate beobachtet, wie ich sie oben (Abschnitt B 4) bei *Nitzschia palea* beschrieben habe. Er führt diese Erscheinung auf die besonderen „Bedingungen der künstlichen Kultur“ zurück. Es wäre zu prüfen, ob nicht auch bei ihm, genau wie in meinen *Nitzschia palea*-Versuchen, die Beleuchtungsverhältnisse eine maßgebliche Rolle gespielt haben.

Bei der gleichen Art hat er ferner das einzige Mal in seinen langjährigen Versuchsreihen (die Versuche wurden bereits im Sommer 1935 begonnen) „eine gewisse Neigung zu einer Längenzunahme“ feststellen können. Während er nämlich in den Jahren 1936 und 1937 eine konstante mittlere Apikallänge der Zellen von 9 bis 10μ gemessen hatte, traten im Sommer 1938 in einem Teil der Kulturen Individuen von 16 bis 18μ Länge auf, ohne daß er Auxosporenbildung feststellen konnte. Diese Beobachtung wird bei einem Vergleich mit meinem in Tabelle V wiedergegebenen Befund bei *Nitzschia palea* ohne weiteres verständlich, wenn man annimmt, daß sich die Entwicklungsbedingungen für WIEDLINGS *Nitzschia Kützingiana* im Jahre 1938 in irgend einer Hinsicht geringfügig verbessert haben (etwa durch eine vielleicht kaum beachtete Änderung der Nährlösungskonzentration, des Silikatgehaltes oder der Konsistenz des Kulturmediums).

Sehr interessant ist ferner der von WIEDLING nach längerer Kultur beobachtete völlige Schalenverlust bei *Nitzschia Kützingiana* var. *exilis*, der das Verständnis der erwähnten plastischen Schalendeformationen bei *Nitzschia palea* erheblich erleichtert. Zeigt er doch, daß die Silikatinkrustation der *Nitzschien*-Membran tatsächlich in weiten Grenzen zu schwanken vermag.

pause, in der die zur nächsten Zellteilung benötigten Assimilate bereitgestellt werden und darauf wird der nächste Teilungsschritt eingeleitet.

11. Gruppenbildung:

Es wurde bereits erwähnt, daß die *Nitzschia palea*-Zellen unterhalb einer Lichtintensität von etwa 500 Lux ihr Bewegungsvermögen verlieren; werden sie in stärkeres Licht zurückgebracht, so kehrt in kurzer Zeit auch ihre Bewegungsfähigkeit zurück. Dieser Verlust des Bewegungsvermögens bei sehr schwachen Lichtintensitäten oder im Dunkeln kann theoretisch zwei verschiedene Gründe haben: entweder der Plasmastrom entlang der Raphe, der im Licht die Bewegungen der Zellen hervorruft, hört im Dunkeln auf zu fließen, oder das Plasma zieht sich unter dem Einfluß der Dunkelheit überhaupt vollkommen aus der Raphe in das Zellinnere zurück, sodaß auf diese Weise gar kein unmittelbarer Kontakt mehr mit dem Substrat besteht. Schließlich wäre auch noch an eine Kombination der beiden genannten Möglichkeiten zu denken.

Da in jedem Falle der Transport von Partikeln entlang der Raphe unmöglich gemacht ist und die Beobachtung im Dunkeln auch schon rein technisch auf erhebliche Schwierigkeiten stößt, war eine Klärung der Frage auf Grund von Beobachtungen in den üblichen Tuscheemulsionen nicht möglich. Durch eine Zufallsbeobachtung in den Planktonkulturen ließ sie sich jedoch eindeutig im zweiten Sinne beantworten. Im Dauerlicht ballen sich nämlich die Zellen bei freischwebender Kultur regelmäßig zu auffälligen Gruppen und Klümpchen zusammen (Abbildung 13), die lebhaft an die bekannten Bakterienagglutinationen erinnern, die man erhält, wenn man die Aufschwemmung bestimmter Bakterienarten mit ihren spezifischen Immunsereen zusammenbringt¹¹. (Diese Ähnlichkeit ist natürlich rein formaler Natur.)

Bringt man derartige Agglutinationsgruppen auf einen Objektträger, so kriechen die Zellen vermöge ihrer Eigenbeweglichkeit alsbald auseinander und schon nach kurzer Zeit (15 bis 20 min) ist von den Agglutinationsklümpchen nichts mehr zu sehen.

In verdunkelten Kulturrohren, in denen die Zellen unbeweglich sind, tritt eine derartige Agglutination niemals ein (Abbildung 14). Die einfachste Erklärung für die auffällige Erscheinung ist daher offenbar die, daß in den belichteten Kulturen die in den Raphen frei zu Tage liegenden Protoplasten bei dem unfreiwilligen Umherwirbeln infolge ihrer Viskosität aneinander haften bleiben und miteinander verkleben. Im Dunkeln dagegen ist ein solches passives gegenseitiges Verkleben der Zellen nicht möglich, weil sich hier die Protoplasten unter

¹¹ Die gleiche Erscheinung hat übrigens auch schon BARKER beobachtet, als es ihm darum zu tun war, für seine Assimilationsuntersuchungen eine homogene Zellaufschwemmung von *Nitzschia palea* herzustellen. Er schreibt: „Suspensions of *Nitzschia closterium* are almost completely homogenous, the cells being separated or grouped in only very small clumps. *Nitzschia palea* is not so satisfactory both because it settles more rapidly and because the cells tend to adhere together in considerable masses. Vigorous shaking helps to avoid these difficulties“ (1935 S. 142).

dem Einfluß der Dunkelheit in das Schaleninnere zurückgezogen haben, womit natürlich gleichzeitig auch die Eigenbeweglichkeit der Zellen beeinträchtigt ist. Eine recht gute Stütze für diese Annahme sehe ich in der Tatsache, daß die Agglutinationsgruppen durch die Überführung in ein kräftiges Plasmolytikum (etwa in 5% KNO_3 -Lösung) in kurzer Zeit vollständig aufgelöst werden.

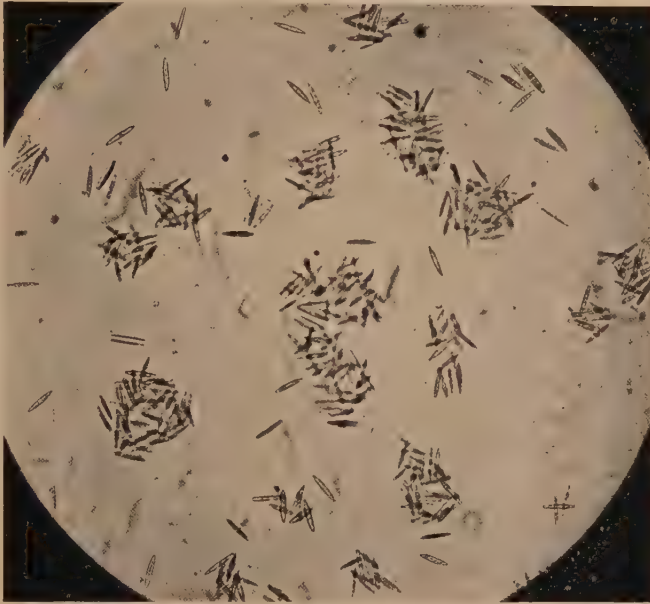


Abb. 13. *Nitzschia palea*, Planktonkultur im Licht: Zellen lebhaft beweglich. Starke „Agglutination“. Plastiden ausgebreitet.

12. Plastidenkontraktion.

Sehr auffällig ist die Erscheinung der Plastidenkontraktion, die sich nach Verdunkelung der Kulturen etwa von der fünften Stunde an allmählich immer deutlicher bemerkbar macht und nach etwa 24 bis 48 Stunden ihren höchsten Grad zu erreichen pflegt. Die beiden normalerweise flach ausgebreiteten, je etwa eine Zellhälfte einnehmenden, gelbbraunen Chromatophoren schrumpfen dabei zu zwei kugeligen Gebilden zusammen, die in der Mitte der Frusteln zu beiden Seiten des Zellkernes nurmehr knapp ein Drittel ihrer normalen Ausdehnung einnehmen (vgl. Abb. 14). Am Licht ist dieser Vorgang, über dessen Ursachen an anderer Stelle ausführlich berichtet werden soll, in wenigen Stunden vollständig reversibel.

Nach Rückübertragung in das Licht gewinnen die Zellen im Verlaufe weniger Sekunden ihre Beweglichkeit zurück. Als erste Lebenserscheinung beobachtet man gewöhnlich ein schwaches Zittern, dem bald kleine ruckartige, zunächst noch ungeordnete Bewegungen folgen, die schließlich in die

normale, ruhige Gleitbewegung übergehen. Diese Bewegung erfolgt auch bei zunächst noch vollständig kontrahierten Chromatophoren: Plastidenkontraktion und Kontraktion des Protoplasten sind also voneinander unabhängig. Wie weit sie sich vielleicht dennoch auf die gleichen Ursachen zurückführen lassen, muß allerdings zunächst noch dahingestellt bleiben.



Abb. 14. *Nitzschia palea*, Planktonkultur im Dunkeln. Zellen unbeweglich, einzeln liegend. Plastiden kontrahiert.

Die Entspreitung der Chromatophoren bis auf ihre normale Größe nimmt etwa zwei bis drei Stunden in Anspruch. Die Lichtintensität scheint auf die Entspreitungsgeschwindigkeit fast ohne Einfluß zu sein.

13. Bedingungen der Fettbildung.

Unter konstanten Entwicklungsbedingungen steigt, wie wir gesehen haben (Abbildung 2, 3 und 5), die Wachstumskurve einer normalen, nicht-„synchronisierten“ *Nitzschia palea*-Population zunächst eine Zeit lang in geometrischer Progression an. Der Verlauf der Wachstumskurve läßt sich in diesem ersten Entwicklungsabschnitt mit dem Verlauf einer monomolekularen, autokatalytischen Reaktion vergleichen. Nachdem jedoch etwa die halbe Besiedlungsdichte des stationären Endzustandes erreicht worden ist, biegt die Wachstumskurve nach rechts um; die Generationsdauer wird m. a. W. allmählich immer länger und die Kurve geht schließlich in die Horizontale über: das Wachstum der Population ist abgeschlossen. Wie bereits betont wurde, ist die maximale Besiedlungsdichte der Kulturen ausschließlich von der Menge der zur Verfügung stehenden Nährstoffe abhängig, während

Temperatur, Lichtintensität und Einsaatdichte — zumindest innerhalb des untersuchten Bereiches — praktisch ohne Einfluß auf die Besiedlungsdichte im stationären Endzustand sind.

Gleichzeitig mit der Verlängerung der Generationsdauer beginnen die Kulturen zu verfetten. Die ersten Anzeichen der beginnenden Verfettung — die durch eine charakteristische Anschwellung der Pyrenoide eingeleitet wird — machen sich also von dem gleichen Zeitpunkt an bemerkbar, wo die Wachstumskurve ihren Wendepunkt durchläuft (Abbildung 15). Unter optimalen Beleuchtungsbedingungen pflegt die Verfettung im allgemeinen bereits nach 60 bis 80 Stunden ihren höchsten Grad zu erreichen. Bei niedrigeren Lichtintensitäten dauert der Vorgang entsprechend länger. So wird die restlose Verfettung z. B. bei 8000 Lux erst nach etwa 8 Tagen erreicht. Morphologisch ist im total verfetteten Zustand praktisch das gesamte Zellumen von einem einzigen riesigen Fett-Tropfen ausgefüllt. Lediglich im Zentrum der Frusteln bleibt eine kleine Aussparung für den an die Seite gedrängten Zellkern fettfrei. Die Gesamtheit der ätherlöslichen Bestandteile („Rohfett“) beläuft sich in diesem Stadium auf etwa 40 bis 42 % des Trockengewichtes¹².

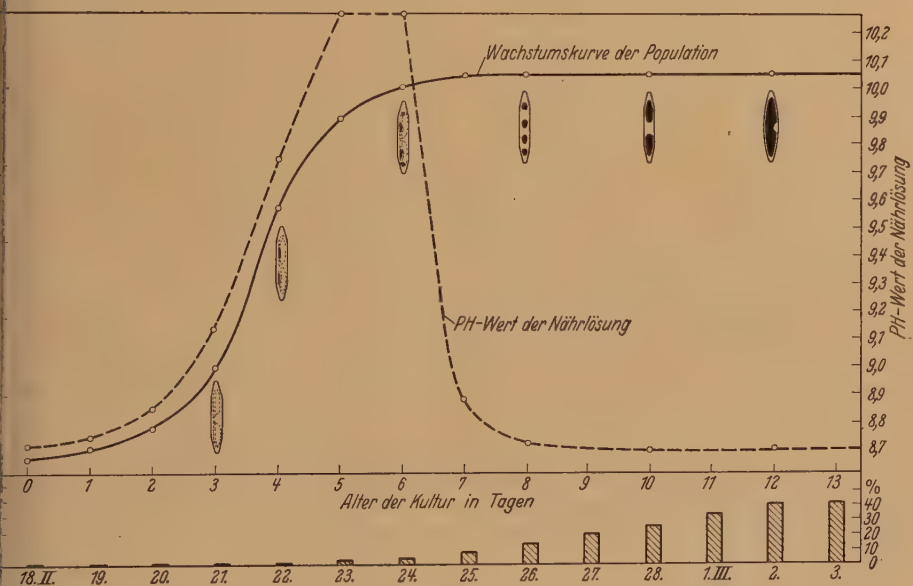


Abb. 15. *Nitzschia palea*, Planktonkultur bei 7000 Lux. Populationsentwicklung, Verfettungsgrad und pH-Wert der Nährlösung. Erste Anzeichen der Verfettung bei Überschreitung des Wendepunktes der Populationskurve. Maximale Verfettung zwei bis drei Tage nach Erreichung des stationären Endzustandes. Der pH-Wert der Nährlösung sinkt mit dem Beginn der Verfettung innerhalb kurzer Zeit auf seinen Ausgangswert pH 8,7 zurück.

¹² Zum Vergleich seien einige Zahlen über den Rohfettgehalt der Samen bekannter Fettpflanzen angeführt (nach BRAUNER-DETMER; Pflanzenphysiol. Praktikum 5. Aufl. 1929 I, S. 61. Sämtliche Angaben in % des Trockenge-

Wir können demnach an der Wachstumskurve der *Nitzschia palea* zwei deutlich unterschiedene Entwicklungsabschnitte erkennen: eine Phase mit maximaler Zellvermehrung, die mit der Erreichung des Wendepunktes ihren Abschluß findet, und eine Phase mit gehemmter Zellvermehrung, die schließlich in absoluten Wachstumsstillstand übergeht. Mit ROBERTSON kann man diese beiden Phasen als die Wachstums- oder Vermehrungsphase und als die Speicherphase der Population unterscheiden. Mit CZURDA kann man sie als das progressive und das regressive Entwicklungsstadium der Kulturen bezeichnen (1935). Wie sogleich noch gezeigt werden soll, sind diese beiden Entwicklungsabschnitte außer durch ihre Teilungsfreudigkeit auch noch durch den verschiedenen *ph*-Wert der Nährlösung deutlich gekennzeichnet.

Lange Zeit hat man die Speicherphase auch wohl als Degenerationsphase bezeichnet, ein Ausdruck gegen den sich neuerdings DENK (1942) mit Schärfe gewandt hat. Ob tatsächlich ein echter „Degenerationszustand“ vorliegt, kann stets erst an der Zeitdauer erkannt werden, welche der „degenerierte“ Organismus benötigt, um nach Übertragung in neue günstige Kulturbedingungen seine normale Vermehrungsfähigkeit zurückzugewinnen („Regenerationsphase“ im Sinne von DENK 1942, S. 633). Stellt sich heraus, daß die Vermehrungsintensität in der Speicherphase keine Einbuße erlitten hat, so ist es sinnlos von einer „Degeneration“ zu sprechen. Nach DENK ist die Vermehrungsintensität ein Ausdruck für den Grad des harmonischen Zusammenwirkens aller am Lebensgeschehen der Zelle teilnehmenden Vorgänge. Durch Änderung der Außenbedingungen kann das harmonische Zusammenwirken dieser Teilvorgänge, für welches er den Begriff der Konkordanz einführt, gestört werden: ein Diskordanzzustand ist sodann die Folge. Jeder Assimilate-Speicherung ist der äußere Ausdruck für einen derartigen Diskordanzzustand mit gestörter Stoffwechselharmonie. (Vgl. hierzu auch v. WIRSCH 1948.)

In unserem Fall handelt es sich um eine spezifische Hemmung des Zellteilungsvorganges der *Nitzschia palea* bei gleichzeitig unbeeinträchtigter Assimilation. Schon BEIJERINCK hat zeigen können, daß „jede Ursache, welche das Wachstum beeinträchtigt, bei übrigens ungestörter Kohlensäureassimilation“ bei den Diatomeen zu einer „kräftigen und leicht sichtbaren Anhäufung von Öltropfen“ Veranlassung gibt (1904, S. 31). Man kann das etwa dadurch erreichen, daß man den Zellen bestimmte, zum Wachstum unbedingt notwendige Elemente — wie z. B. den assimilierbaren Stickstoff — entzieht. Der einfachste Weg dürfte jedoch die von mir stets mit Erfolg angewandte Übertragung in reines destilliertes Wasser sein. Selbstverständlich bleiben jedoch alle derartigen Manipulationen im Dunkeln absolut wirkungslos.

wichtiges): *Linum usitatissimum* 34%, *Papaver somniferum* 41%, *Brassica rapa* 46%, *Ricinus communis* 47%, *Juglans regia* 65%.

In der einzelligen Grünalge *Chlorella pyrenoidosa* soll nach den Angaben von SPOEHR und MILNER unter optimalen Bedingungen ein Lipoidgehalt von 85,6% auftreten können (Carnegie Inst. of Washington Year Book 45, 109, 1946).

Im Gegensatz zu dieser „Hungerverfettung“ beruht die normale „Altersverfettung“ der Diatomeenkulturen auf der Anhäufung spezifischer Wachstumsinhibitoren (v. DENFFER, 1948), welche die CO_2 -Assimilation zunächst völlig unbeeinflusst lassen und auf diese Weise gleichfalls zur Entstehung eines Diskordanzzustandes Veranlassung geben. Ein grundsätzlicher Unterschied zwischen „Altersverfettung“ und „Hungerverfettung“ besteht jedoch nicht.

14. Biologische Bedeutung des Diatomeenfettes.

Über die biologische Bedeutung des Diatomeenfettes liegen, soweit ich sehe, bisher keinerlei wirklich exakte Untersuchungen vor. Handelt es sich tatsächlich, wie man zunächst wohl ziemlich allgemein angenommen hat, um die Ablagerung von „Reservestoffen“? — oder hat vielmehr HÖFLER recht, wenn er glaubt, die Fetтанreicherung in den Kulturen und am natürlichen Standort in der Regel als „Krankheitssymptom“ werten zu müssen (1940 S. 105)? Für die erste Deutung spricht die Beobachtung, daß das Fett, das unter ungünstigen Kulturbedingungen entstanden ist, bei der Wiederherstellung günstigerer Entwicklungsbedingungen (Zufuhr von Sauerstoff bzw. Übertragung in frische Nährlösung) wieder resorbiert wird. Die zweite Deutung gewinnt dagegen an Wahrscheinlichkeit, wenn man an gewisse äußere Ähnlichkeiten denkt, welche die Diatomeenverfettung mit der „fettigen Degeneration“ der Plastiden mancher höherer Pflanzen gemeinsam hat, bei der Alterserscheinungen und Abbauvorgänge zweifellos eine ausschlaggebende Rolle spielen (vgl. KÜSTER, 1935 und 1937). Die Entscheidung kann nur das Experiment erbringen, in dem geprüft wird, welche Zeit der verfettete Organismus benötigt, um nach erneuter Übertragung in günstige Kulturbedingungen seine normale Vermehrungsintensität zurückzugewinnen (Regenerationsphase im Sinne von DENK). Stellt sich heraus, daß in der Speicherphase überhaupt keine Minderung des Reproduktionsvermögens eingetreten ist, so wäre es sinnlos, die bloße Tatsache der „Diskordanz“ als Krankheitssymptom zu bewerten.

Vergleicht man unter diesem Gesichtspunkt die Entwicklung zweier *Nitzschia palea*-Kulturen, die sich lediglich durch den „physiologischen Zustand“ ihres Impfmateriāls unterscheiden, indem die eine mit normalem, unverfettetem Impfmateriāl aus der Wachstumsphase angesetzt wird, während die andere auf maximal verfettete Zellen vom stationären Endzustand einer zweiten Kultur des gleichen Klon zurückgeht, so zeigt sich, daß bei niedrigeren Lichtintensitäten (5000 Lux und darunter) das verfettete Impfmateriāl stets einen merklichen Entwicklungsvorsprung vor dem unverfetteten Material erzielt (Abb. 16): von einer Hemmung des Reproduktionsvermögens der verfetteten Zellen kann also gar keine Rede sein. Das Diatomeenfett darf somit als ausgesprochenes Speichermateriāl angesehen werden, das unter ungünstigen Assimilationsbedingungen (niedrige Lichtintensität) mobilisiert und zur beschleunigten Durchführung neuer Zellteilungen herangezogen wird. Wiederholt man den gleichen Versuch bei höheren Lichtintensitäten (oberhalb 7000 Lux),

so wird dieser Effekt allerdings immer undeutlicher und verschwindet schließlich ganz.

Überführt man total verfettete *Nitzschia palea* Zellen vom stationären Endzustand einer mit Hemmstoffen angereicherten Kultur (vgl. v. DENFFER, 1948) im Dunkeln in eine frisch zubereitete, hemmstofffreie Normalernährungslösung, so findet selbst im Dunkeln, bei völligem

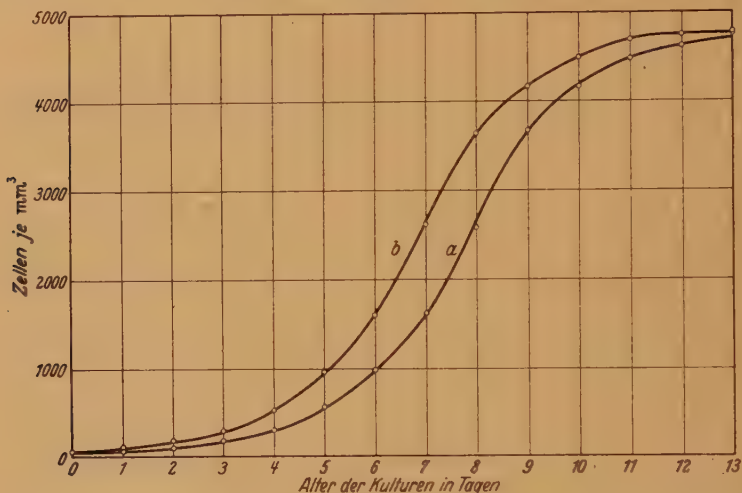


Abb. 16. *Nitzschia palea*, Populationsentwicklung bei 1000 Lux. a = normales, unverfettetes Impfmaterial. b = total verfettetes Impfmaterial vom stationären Endzustand. Deutliche Entwicklungsförderung bei verfettetem Impfmaterial.

Ausschluß der CO_2 -Assimilation, im Laufe der nächsten 32 Stunden eine neue Zellteilung statt, bei der die Fettreserven in der Regel bis auf unbedeutende Reste aufgebraucht werden.

Die Wiedergabe eines Versuchsprotokolls vom März 1946 mag das Ergebnis eines derartigen Versuches verdeutlichen: Ausgangsmaterial: a) stark verfettete Zellen vom stationären Endzustand einer Planktonkultur vom 25. 2. (10 000 Lux Dauerlicht). b) unverfettetes Zellmaterial einer gleichaltrigen Parallelkultur, die jedoch ab 1. 3. verdunkelt wurde. Einsaatdichte etwa 450 Zellen je mm^3 . Versuchsbeginn 9. 3. 10 Uhr. Die Zelldichtebestimmungen erfolgten in regelmäßigen 24-stündigen Abständen. Das Versuchsergebnis ist in Tabelle VI zusammengestellt.

Besonders aufschlußreich ist die Tatsache, daß sich die verfetteten Zellen sogar in völlig nährstoffreiem destilliertem Wasser im Dunkeln zu teilen vermögen. Aus dieser Tatsache geht eindeutig hervor, daß offenbar auch sämtliche zur Durchführung einer Zellteilung erforderlichen Salze in genügender Menge bereitgestellt worden sein müssen; deutlicher kann die Reservestoffnatur des Diatomeenfettes wohl kaum mehr demonstriert werden.

Vielleicht lassen sich auf diese Weise gewisse widersprüchliche Beobachtungen von RICHTER (1906 S. 94f.) und KARSTEN (1901 S. 416f.) er-

Tabelle VI.

Nitzschia palea. Vermehrung verfetteter Kulturen im Licht und im Dunkeln nach Übertragung in frische Nährlösung (A) bzw. in doppelt destilliertes Wasser (B). Sämtliche Werte aus den Zählungen zweier Kulturrohre gemittelt.

Lichtintensität u. Verfettungsgrad	Serie	Zelldichte in mm ³			
		9. 3.	10. 3.	11. 3.	12. 3.
14000 Lux unverfettet	A	450	1750	5040	5050
	B	450	470	460	470
14000 Lux verfettet	A	460	1770	5160	5100
	B	450	690	970	960
Dunkel unverfettet	A	450	450	440	450
	B	440	440	450	440
Dunkel verfettet	A	450	880	920	940
	B	440	910	940	930

klären: KARSTEN hatte nämlich behauptet, daß sich *Nitzschia palea* bei Zufuhr organischer Nährstoffe auch im Dunkeln zu teilen vermöge, während RICHTER in seinen Reinkulturen selbst bei reichlicher Zufuhr von Traubenzucker, Asparagin und Glykokoll keine nennenswerte Vermehrung festzustellen vermochte. Nur in den ersten Tagen der Verdunkelung hält auch er eine „anfängliche minimale Vermehrung“ für möglich, die jedoch sehr bald zum stocken komme. Beide Autoren haben dem „physiologischen Zustand“ ihres Ausgangsmaterials keine Beachtung geschenkt. Der ganze geheimnisvolle Vorgang der „photomechanischen Induktion der Zellteilung“ klärt sich aber augenblicklich auf, wenn man annimmt, daß in dem einen Falle verfettete, im anderen dagegen unverfettete Zellen als Ausgangsmaterial gedient haben.

Schließlich sei noch kurz auf die Bedeutung der Diatomeenverfettung für die Trockenresistenz der Zellen hingewiesen. Daß viele Diatomeenarten längere Trockenperioden lebend zu überstehen vermögen, wird durch zahlreiche ökologische Beobachtungen nahegelegt. KÜSTER (1946) hat jedoch erst kürzlich zeigen können, daß beim Eintrocknen der Frusteln normalerweise sofort Luft in das Zellinnere eindringt, wobei häufig die Kieselpanzer zersplittern oder zerbrechen. Denkt man sich nun den wässrigen Vakuoleninhalt der Zellen durch fettes Öl ersetzt, wie das im Freien infolge der verschlechterten Lebensbedingungen in der Regel der Fall sein dürfte, ehe die restlose Eintrocknung der Frusteln droht, so ist zu erwarten, daß der Wasserentzug erheblich erschwert und die Gefahr des Eindringens von Luft in das Zellinnere entsprechend vermindert sein wird. Die Fettspeicherung könnte somit sehr wohl den Schlüssel zur Klärung des Problems der Trockenresistenz der Diatomeen abgeben. Leider sind jedoch alle diesbezüglichen Versuche mit *Nitzschia palea* durchaus negativ verlaufen.

Unverfettetes und verfettetes Zellmaterial wurde auf den verschiedensten Unterlagen (Filtrierpapier, Tonscherben, Glaswolle, Watte, Mull, Müllergaze u. a. m.) bei verschiedenen Temperaturen schnell (in 5 bis 10 min) und langsam (im Verlaufe mehrerer Tage) getrocknet und darauf z. T. sofort, z. T. nach einer längeren Ruheperiode in frische Nährlösung übertragen: sämtliche Zellen waren tot. *Nitzschia palea* ist somit auch im total verfetteten Zustand

gegen Austrocknung äußerst empfindlich. Eine Beziehung zwischen Verfettungsgrad und Trockenresistenz ließ sich nicht nachweisen.

Auf die Bedeutung des Diatomeenfetts für die Planktongenese wird im Abschnitt D noch kurz zurückzukommen sein.

15. pH -Wert der Nährlösung.

Interessant ist es, während des Wachstums der Kultur und während der anschließenden Verfettung den pH -Wert der Nährlösung zu verfolgen. Der pH -Wert der frisch angesetzten „Normallösung“ liegt annähernd bei 10,2; sie reagiert also ziemlich stark alkalisch. Läßt man die Lösung jedoch unbeimpft bei Zimmertemperatur offen stehen, so sinkt der pH -Wert regelmäßig durch CO_2 -Absorption aus der Luft innerhalb weniger Stunden auf etwa pH 8,7 ab. Dieser Vorgang läßt sich durch künstliche CO_2 -Zufuhr erheblich beschleunigen und verstärken. Es gelingt z. B. den pH -Wert durch einfaches Hindurchblasen von Atemluft innerhalb weniger Minuten auf pH 7,1 hinabzudrücken. Auch in diesem Falle stellt sich jedoch an der Luft allmählich der gleiche Endzustand mit pH 8,7 ein. Verhindert man umgekehrt die CO_2 -Zufuhr, indem man die Aufbewahrungskolben fest verkorkt, so verändert sich der pH -Wert auch bei längerem Stehen nur unerheblich.

Beimpft man ein Kulturrohr, dessen Nährlösung durch 12-stündige Durchlüftung den Gleichgewichtszustand mit der Luft erreicht hat, mit Diatomeen, so steigt der pH -Wert der Nährlösung am Licht langsam wieder an. Dieser neue pH -Anstieg weist, wie Abbildung 14 zeigt, deutliche Beziehungen zur jeweiligen Populationsdichte der Kultur auf und das Maximum (pH 10,3 bis 10,4) wird etwa zur gleichen Zeit mit der maximalen Besiedlungsdichte der Kultur erreicht. Diese neue Alkalisierung läßt sich zwanglos auf den Kohlensäureverbrauch bei der CO_2 -Assimilation der Algen zurückführen, denn vorübergehende Verdunkelung der Kulturen hat innerhalb weniger Stunden erneutes Absinken auf den Ausgangswert 8,7 zur Folge. Gleichzeitig mit der Erreichung des stationären Endzustandes findet aber schließlich auch im Licht ein abermaliger rapider Abfall des pH -Wertes auf etwa pH 8,7 statt. Diese Verschiebung dürfte in unmittelbarem Zusammenhang mit der Fettbildung stehen, da ja bekanntlich bei der Umwandlung von Kohlenhydraten in Fett stets eine intensive CO_2 -Abspaltung erfolgt (BERNHAEUER, 1943 S. 349f.). Das Konkordanzstadium der *Nitzschia-palea*-Kulturen (bzw. ihre Wachstumsphase oder ihr progressives Entwicklungsstadium) ist also durch einen ansteigenden, das Diskordanzstadium (die Speicherphase oder das regressive Entwicklungsstadium) dagegen durch einen abfallenden pH -Wert gekennzeichnet.

C. Natürliche Massenvorkommen von Planktonorganismen.

Für die Bewertung der im experimentellen Teil dieser Arbeit zusammengestellten Ergebnisse ist es von Interesse, welche Planktondichten unter natürlichen Bedingungen auftreten können, und wie sich die Erträge der *Nitzschia palea* in planktischer Massenkultur zu den

Erträgen echter Planktonorganismen verhalten. Daher sei zum Schluß noch kurz auf einige diesbezügliche Angaben aus der limnologischen Literatur hingewiesen.

Zur Beantwortung der ersten Frage sind in Tabelle VII und VIII die Zell- und Trockengewichtserträge der *Nitzschia palea*-Planktonkulturen mit entsprechenden Ertragsangaben über natürliche Massenvegetationen verschiedener Phytoplanktonen zusammengestellt.

Tabelle VII. *Natürliche Massentwicklung verschiedener Planktonorganismen im Vergleich zu den Ernteerträgen, die mit der benthonischen Nitzschia palea bei planktischer Massenkultur erzielt wurden (Individuenzahlen im Liter).*

Fundort und Zusammensetzung des natürlichen Massenvorkommens:	Zellen im Liter:	Autor:
Vegetationsfärbende Assoziation verschiedener Grünalgen und Flagellaten im Ententümpel zu Haidshloß (Ostholstein). 1. Oktober 1921. Vorwiegend: <i>Chlorella</i> , <i>Cryptomonas</i> , <i>Chroomonas</i> , <i>Chlamydomonas</i> , <i>Scenedesmus</i> , <i>Euglena</i>	50 000 000 000	UTERMÖHL, 1925, S. 471
Vegetationsfärbende Assoziation verschiedener, nicht näher bestimmter grüner Algen von ca. 5 μ Durchmesser in einem kleinen Freiluftbassin mit reichlich verwesenden Pflanzenteilen. Aneboda (Schweden)	40 000 000 000	NAUMANN, 1919, S. 44.
Vegetationsfärbende Assoziation von <i>Ankistrodesmus falcatus</i> var. <i>spirilliformis</i> . Freiluftbassin im Bot. Garten von Aneboda (Schweden). 18. Mai 1912	12 000 000 000	NAUMANN, 1919, S. 43
Vegetationsfärbende Assoziation verschiedener <i>Chlorellen</i> in einem kleinen nährstoffreichen Freiluftbassin. Aneboda (Schweden)	10 000 000 000	NAUMANN, 1919, S. 48
Planktische Massenkultur der benthonischen <i>Nitzschia palea</i> (25 μ lang, 4 bis 5 μ breit)	5 200 000 000	eigene Untersuchungen
Vegetationsfärbende <i>Chlorella</i> -Produktion in einem Berliner See	1 000 000 000	KOLKWITZ, 1911, zitiert b. NAUMANN, 1919, S. 42
<i>Dictyosphaerium Ehrenbergianum</i> . August 1924 im Pinnsee (Ostholstein)	700 000 000	UTERMÖHL, zitiert bei Lenz 1928, S. 73
<i>Stephanodiscus hantzschii</i> var. <i>pusilla</i> im großen Eutiner See. 21. März 1926	226 000 000	UTERMÖHL, 1927, S. 510
<i>Stephanodiscus Hantzschii</i> var. <i>pusilla</i> im Lietzensee bei Berlin. 6. Dez. 1908	58 000 000	KOLKWITZ, 1914, S. 653
Abgetrennte Brackwassergebiete der Ostsee bei Rügen	40 000 000	GESSNER, 1934, S. 159

Selbstverständlich lassen die Zelldichteangaben der Tabelle VII noch keinen unmittelbaren Vergleich mit den *Nitzschia palea*-Erträgen zu, da ja bei dieser Zusammenstellung die Größe der Organismen zunächst völlig außer Betracht gelassen worden ist. Soweit es sich jedoch um relativ einheitlich zusammengesetzte und genau definierte Assoziationen handelt und die Durchschnittsgröße der in Frage stehenden Arten annähernd bekannt ist, lassen sich auch schon aus diesen Zahlen gewisse Rückschlüsse auf die absolute Dichte der organischen Substanz ziehen, so daß ein grober Vergleich der Werte möglich wird.

Die höchste bisher beobachtete und zahlenmäßig erfaßte „Überproduktion“ von Planktonorganismen ist m. W. von UTERMÖHL mitgeteilt worden, der am 1. Oktober des Jahres 1921 nach dem besonders sonnigen und trockenen Herbst dieses Jahres bei der Auszählung einer vegetationsfärbenden Assoziation verschiedener *grüner Algen* in dem kreisrunden, etwa 20 m im Durchmesser messenden „Ententümpel“ zu Haidtschloß (Ostholstein) eine Besiedlungsdichte von etwa $50 \cdot 10^9$ Zellen im Liter feststellen konnte (UTERMÖHL, 1925 S. 471). In kleineren Freiluftbassins, in denen die Nährstoffe die erforderliche Konzentration leichter erreichen, scheinen derartige Planktondichten häufiger vorzukommen, denn schon 1919 hat NAUMANN über eine ganz ähnliche Massenentwicklung kleiner, leider nicht näher bestimmter *grüner Algen* von etwa 5μ Durchmesser in einem Bassin des Botanischen Gartens von Aneboda (bei Lamshult in Schweden) berichtet. Er stellte damals eine Besiedlungsdichte von etwa $40 \cdot 10^9$ Zellen im Liter fest (1919 S. 44).

Nehmen wir auch für die Massenvegetation im Ententümpel einen wahrscheinlich eher zu hoch gegriffenen mittleren Durchmesser von 5μ je Zelle an, und setzen wir ferner der Einfachheit halber annähernd kugelförmig gestaltete Zellen voraus, so würde sich das Volumen der Einzelzelle auf etwa $65 \mu^3$ berechnen. Im Liter befanden sich demnach im Ententümpel nach grober Schätzung maximal etwa $3,25 \text{ cm}^3$ und im Freiluftbecken in Aneboda etwa $2,6 \text{ cm}^3$ Algenmasse¹³.

Die in den oben beschriebenen Versuchen verwendeten *Nitzschia palea*-Zellen hatten eine mittlere Größe von durchschnittlich 26 bis 30μ , bei einem mittleren Durchmesser von etwa 4μ . Betrachtet man die Einzelzelle in grober Annäherung als rechteckiges Prisma von 28μ Länge und 4μ Durchmesser, so ergibt sich daraus ein mittleres Volumen von etwa $448 \mu^3$. Der Liter Kulturlösung enthielt demnach auf dem stationären Endzustand eine durchschnittliche Gesamtmasse von etwa $2,33 \text{ cm}^3$ Diatomeen, d. h. bei künstlicher Planktonkultur steht der Ertrag dieses natürlichen Benthonten dem Ertrag echter Planktonorganismen unter optimalen Freilandbedingungen kaum nach.

Noch weit günstiger gestaltet sich der Vergleich, wenn man nicht die Massenentfaltung beliebiger Phytoplanktonen betrachtet (in den beiden soeben herangezogenen Beispielen handelt es sich ja in erster Linie um *Grünalgen* und *Flagellaten*), sondern sich auf die in der freien Natur beobachteten Massenvorkommen planktonischer Kieselalgen beschränkt.

Die dichteste bisher quantitativ erfaßte Massenvegetation planktischer Diatomeen ist m. W. die ausgeprägt vegetationsfärbende Massenentfaltung

¹³ Es muß an dieser Stelle betont werden, daß derart extreme Besiedlungsdichten zweifellos nur ganz vorübergehend auftreten können, da schon eine nur wenige Zentimeter dicke Schicht einer derartigen Assoziation das Licht praktisch restlos absorbiert, so daß die in den tieferen Schichten lebenden Individuen in kurzer Zeit einfach verhungern müßten.

von *Stephanodiscus hantzschii* var. *pusilla*, die im März des Jahres 1922 von UTERMÖHL im Heidensee (Ostholstein) ausgezählt wurde. Neben maximal $93 \cdot 10^6$ Zellen der genannten Art und einigen unbedeutenderen Begleitern fanden sich in der genannten Assoziation im Liter $2,9 \cdot 10^6$ *Cyclotellen*, $1,9 \cdot 10^6$ Individuen von *Stephanodiscus astraea* und $1,1 \cdot 10^6$ Individuen von *Nitzschia acicularis*. Bei Zugrundelegung der von UTERMÖHL selbst angegebenen Größewerte errechnet sich aus diesen Zahlen das Gesamtvolumen der Biomasse auf größenordnungsmäßig etwa 40 bis 50 Kubikmillimeter Diatomeen im Liter; die genannte natürliche Massenvegetation erreichte demnach nur einen verschwindenden Bruchteil des mit dem Nichtplanktonen *Nitzschia palea* in künstlicher Planktonkultur erzielten Dichtewertes.

Trockengewichtsbestimmungen von planktischen Massenvegetationen liegen leider in noch geringerer Zahl vor, als Zelldichtebestimmungen. Die wenigen in Tabelle VIII zusammengestellten Werte, die sich ausschließlich auf das relativ arme Seenplankton beschränken, bilden jedoch eine willkommene Ergänzung zu der vorigen Tabelle und lassen gleichfalls erkennen, daß die normalen natürlichen Massenentfaltungen von Planktondiatomeen weit hinter den Erträgen künstlicher Planktonkulturen der *Nitzschia palea* zurückbleiben.

Tabelle VIII. *Natürliche Massenentwicklung einiger Planktonorganismen im Vergleich zu den Ernteerträgen, die mit der benthonischen Nitzschia palea bei planktischer Massenkultur erzielt wurden (Trockensubstanzmenge in m³).*

Fundort und Zusammensetzung des natürlichen Massenvorkommens:	Trockensubstanz g im m ³	Autor:
<i>Nitzschia palea</i> in planktischer Massenkultur	980,0	eigene Untersuchungen
Vegetationsfärbende Assoziation von <i>Oscillatoria Agardhii</i> im Lietzensee bei Berlin. 15. Aug. 1914	25,0	KOLKWITZ, 1914, S. 650
Vegetationsfärbende Diatomeenmassenentfaltung im Heidensee (Ostholstein). Vorwiegend: <i>Stephanodiscus Hantzschii</i> var. <i>pusilla</i> und <i>St. astraea</i> , neben <i>Cyclotella</i> und <i>Melosira</i>	14,3	UTERMÖHL, 1925, S. 489
Optimale Phytoplanktonentfaltung im Schleinsee bei Langenargen nach künstlicher Phosphatdüngung	6,0	EINSELE, 1941, S. 482
Massenentwicklung von <i>Oscillatoria Reiskei</i> mit Begleitern im Plöner See (Heidensee). Nov. 1932	3,0	UTERMÖHL, 1925, S. 481

Über die künstliche Massenkultur von Planktondiatomeen liegt mir nur ein Bericht von KETCHUM und REDFIELD aus dem Jahre 1938 vor. Diese Autoren erzielten mit der marinen *Nitzschia closterium* eine maximale Besiedlungsdichte von $13,8 \cdot 10^9$ Zellen im Liter. Da nach ihren Angaben $62 \cdot 10^9$ Zellen dieser Art ein Trockengewicht von annähernd 1 g ergaben, errechnet sich der maximale Literertrag auf etwa 0,22 g Trockengewicht. Wenn man bedenkt, daß die kleinere *Nitzschia palea* bei einer Maximalproduktion von $5,2 \cdot 10^9$ Zellen im Liter bereits ein Trockengewicht von 0,98 g/l ergab,

lassen sich diese Zahlen, auch bei Annahme eines wesentlich niedrigeren spezifischen Gewichtes der *Nitzschia closterium*, nur schwer verstehen. Jedenfalls aber läßt sich der Ertrag der benthonischen *Nitzschia palea* bei künstlicher Planktonkultur mit dem Ertrag des echten Plankters *Nitzschia closterium* größenordnungsmäßig durchaus vergleichen.

D. Schlußbetrachtung.

Offenbar stellt also die ihrer ganzen Struktur und natürlichen Verbreitung nach litoral-benthonische *Nitzschia palea* eine interessante Übergangsform zwischen Litoral- und Planktonorganismus dar und vermag daher aufschlußreiche Hinweise zu geben, wie sich die echten Planktonten von den *Grunddiatomeen* der Uferregion ableiten lassen, sofern diese eine Reihe bestimmter Voraussetzungen erfüllen.

Als wichtigste dieser Voraussetzung für die Planktongenese betrachtet HUBER-PESTALOZZI (1938 Teil I S. 51) bei den in Frage kommenden Benthos-Organismen die Fähigkeit, den gesamten Lebenszyklus — also vor allem auch die Vermehrung — im freien Wasser abwickeln zu können. Wie eingangs betont wurde, hat die Erfahrung gelehrt, daß diese Fähigkeit nur verhältnismäßig wenigen pennaten *Grunddiatomeen* zugesprochen werden kann, da die große Mehrzahl ohne das Vorhandensein einer festen Unterlage nicht zur Vermehrung zu bringen ist. Daß bei spezieller Berücksichtigung der Diatomeen natürlich nur Arten mit asexueller Auxosporenbildung (Parthenoauxosporen) als Planktonbildner in Frage kommen, liegt auf der Hand¹⁴.

Als zweite wichtige Voraussetzung für die natürliche Planktongenese muß ferner ein relativ niedriges spezifisches Gewicht gefordert werden. Dieser Forderung kommt zweifellos die bei den *Nitzschien* verbreitete schwache Verkieselung der Zellmembranen wirksam entgegen, die ja — wie bereits betont — zugleich das sekundäre Größenwachstum der Zellen ermöglicht.

Weiterhin dürfte sehr wahrscheinlich auch die den meisten *Nitzschien* eigene Fähigkeit zu besonders kräftiger Verfettung bei der Planktongenese eine maßgebliche Rolle spielen, denn es hat sich gezeigt, daß auf diese Weise eine erhebliche Verminderung der Sink-

¹⁴ Im Gegensatz zu dem Verhalten der meisten übrigen *Nitzschien* erfolgt die Auxosporenbildung der *Nitzschia palea* nach MIQUEL (zit. b. GEITLER, 1932 S. 220 und KARSTEN, 1899 S. 182) genau wie bei *Nitzschia paradoxa* ohne Kopulation, also entweder autogam durch Pädogamie oder apomiktisch durch Parthenogenese. Nach meinen eigenen Beobachtungen möchte ich mich der ersten Auffassung anschließen, da ich vor der Auxosporenbildung, bei der es in vielen Fällen zu sehr auffälligen Aufblähungen und Deformationen der Mutterzellen kommt, regelmäßig eine Verdoppelung der Plastidenzahl und die Ausbildung von vier mikrosprorenähnlichen Gebilden beobachten konnte, wie sie KOLBE (1927) bereits früher bei *Nitzschia vitrea* beschrieben hat und als zusammengeballte Chromatophoren mit je einem kernähnlichen Pyrenoid identifizieren konnte. Die normale Zweizahl der Chromatophoren wird erst bei der ersten Zellteilung der jungen Auxosporen wiederhergestellt.

geschwindigkeit zustande kommen kann. Nun ist bekannt, daß die Assimilationsbedingungen im Pelagial normalerweise günstiger zu sein pflegen, als in der Uferregion (vgl. RUTTNER, 1940 S. 55), während umgekehrt die Mineralsalzernährung für die in das freie Wasser hinausgetriebenen Individuen im allgemeinen ungünstiger sein wird, als im Litoral, wo sich größere Massen in Zersetzung befindlicher Pflanzenreste häufen. Beide Umstände vereint werden daher im freien Wasser die physiologische Grundlage für das Auftreten des oben erwähnten „Diskordanzzustandes“ abgeben müssen, der die Zellen zur Ablagerung ihres Assimilateüberschusses in der Form fetten Öls zwingt. Es ist daher sehr wahrscheinlich, daß gerade die durch Zufall in das Pelagial hinausgetriebenen Diatomeenzellen mit Verfettung auf die neue Umwelt reagieren werden. Es wäre jedoch völlig verfehlt, wenn man darin eine zweckmäßige „Anpassung“ an den neuen Lebensraum sehen wollte, da sich diese „Reaktion“ rein physiologisch durch den Zwang der Außenfaktoren erklären lassen würde. Leider liegen mir noch keine eigenen Beobachtungen über den Verfettungsgrad erratoplanktischer und planktischer *Nitzschien* vor; vielleicht darf aber das häufige Auftreten von Öltröpfchen in den verschiedensten *Planktondiatomeen* als erster bestätigender Hinweis in der angedeuteten Richtung gewertet werden.

Bei Berücksichtigung dieser Tatsachen kann es nicht verwundern, wenn in der Gattung *Nitzschia* neben zahlreichen Litoralformen auch eine ganze Reihe echter Planktonten vorkommt (vgl. HUBER-PESTALOZZI 1942 S. 470f.) und wenn sich darüberhinaus unter den Grundbewohnern eine größere Anzahl typischer Übergangsformen findet, die entweder in der Form besonderer Lokalvarietäten als echte Planktonten auftreten, wie z. B. *Nitzschia fonticola* var. *pelagica* im Eutiner See, oder doch zumindest tycho- oder epiplanktisch beobachtet worden sind, wie die bereits mehrfach erwähnte *Nitzschia acicularis*. Bevorzugt epiplanktisch scheint *Nitzschia Kützingeri* aufzutreten, von der es bei KRIEGER heißt: „Oft sind die Kolonien von *Cyanophyceen* (*Microcystis*, *Chroococcus*) reichlich damit besetzt“ (Zit. n. HUBER-PESTALOZZI, II/2 S. 476). Ein typischer Epiplankter scheint weiterhin *Nitzschia epiphytica* zu sein, die nach O. MÜLLER gewöhnlich auf *Melosira nyassensis* auftritt, wobei letztere häufig dicht von ihr überzogen sein soll (HUBER-PESTALOZZI, II/2 S. 477).

Von diesen Übergangsformen ist der Sprung zur völlig freien Lebensweise nicht mehr weit und so finden wir denn in der bereits erwähnten halophilen *Nitzschia closterium* und einer größeren Reihe weiterer Brack- und Süßwasserarten tatsächlich eine größere Zahl echter Planktonorganismen, die sich zum Teil sogar in ihren sekundären Organisationsmerkmalen (Schwebefortsätze der *Nitzschia closterium*, Gruppenbildung bei *Nitzschia holsatica* und *actinastroides*) an den neuen Lebensraum angepaßt haben. Unter den tropischen Arten mag ein Hinweis auf *Nitzschia asterionnelloides*, *N. lancettula*, *N. pelagica* und *N. gracilis* genügen, die sämtlich im Oberflächenplankton des Nyassasees auftreten (HUBER-PESTALOZZI II/2).

So vermittelt die durch eine weitgehende morphologische Ähnlichkeit ihrer Arten eindeutig charakterisierte Gattung *Nitzschia* mit ihren verschiedenen euryöken Übergangsformen gleichsam eine geschlossene Entwicklungsreihe, die — ausgehend von reinen Benthonten — einerseits zu echten Erddiatomeen des Edaphons, andererseits aber auch zu echten Planktonten des Pelagials hinüberleitet. *Nitzschia palea* nimmt insofern innerhalb ihrer Gattung eine besondere Stellung ein, als sie auf Grund ihrer außergewöhnlich breiten ökologischen Valenz sowohl in der einen, als auch in der anderen Richtung vorzustößen vermag.

Die eingehende Betrachtung der physiologischen Daten dieser Art läßt ferner deutlich erkennen, daß die für die Planktongenese wichtigsten physiologischen und organisatorischen Eigenschaften — also die Fähigkeit zur Vermehrung ohne das Vorhandensein einer festen Unterlage und das niedrige spezifische Gewicht — nicht erst auf dem Wege einer „Anpassung“ an den zu erobernden Lebensraum neu hinzu erworben werden, sondern daß diese Eigenschaften von vornherein gegeben sein müssen, wenn die Ausweitung des Lebensraumes gelingen soll. Die für die Planktongenese erforderlichen Eigenschaften sind also bereits in der alten, ursprünglichen Umwelt in aller Ruhe vorbereitet worden, so daß der endgültige Übergang in den neuen Lebensraum gar kein Wagnis mehr bedeutet. Es ist daher auch völlig überflüssig anzunehmen, daß das Protoplasma der zufällig einmal in das freie Wasser hinausverschlagenen Individuen „unter einem äußeren Zwange“ stehe, auf den es irgendwie „reagieren“ müsse, wie das HUBER-PESTALOZZI (I) S. 47) für notwendig erachtet, um das Zustandekommen der Vermehrung im freien Wasser als jetzt erst nützliche Neuerwerbung verständlich zu machen.

Die grundlegenden Mutationen, an die HUBER-PESTALOZZI denkt, sind keineswegs erst die Folge, sondern vielmehr die Voraussetzung für den Übergang zur schwebenden Lebensweise; lediglich gewisse sekundäre Schwebeanpassungen — wie etwa die Schwebefortsätze bei *Nitzschia closterium* oder die Ausbildung büschelig-sternförmiger Kolonien bei *Nitzschia holsatica* — mögen späterhin als echte „Anpassungen“ an den neuen Lebensraum hinzu erworben worden sein. Die ursprünglichsten Plankter dürften dagegen ihren litoralen Vorfahren sowohl morphologisch als auch physiologisch absolut gegliichen und sich erst nach ihrem Übertritt in das freie Wasser hier und dort in einer der ange deuteten Richtungen weiterentwickelt haben.

Zusammenfassung der Ergebnisse:

1. Es wird eine Kulturmethode beschrieben, mit deren Hilfe es gelingt, gewisse normalerweise benthonisch lebende *Diatomeen*arten (*Naviculeen*, *Nitzschieen*) freischwebend (planktisch) zu kultivieren und zu kräftiger Vermehrung zu bringen.

2. Die planktische Kultur, die zum ersten Mal die Aufstellung exakter Vermehrungskurven der genannten Diatomeengruppen ermöglicht, wird dazu benutzt, eine Reihe der wichtigsten physiologischen Daten der *Nitzschia palea* zu bestimmen, um auf diese Weise einen Einblick in ihre ökologischen Ansprüche und die Gesetzmäßigkeiten ihrer Verbreitung zu gewinnen.

3. Die endgültig erreichte Besiedlungsdichte einer *Nitzschia palea*-Kultur ist ausschließlich von der Konzentration der Nährstoffe abhängig; sie ist dagegen unabhängig von der Temperatur, von der Einsaatdichte und von der Lichtintensität. Entsprechend dem MITSCHERLICHschen Ertragsgesetz sind die Gesamterträge relativ zur aufgewendeten Nährstoffmenge umso günstiger, je niedriger die Ausgangskonzentration der Nährsalze gewählt wird.

4. Das Temperaturoptimum der *Nitzschia palea* liegt bei etwa 35° C; selbst 45° C werden vorübergehend ohne Schaden ertragen. Dieses hohe Temperaturoptimum dürfte in erster Linie für die weite Verbreitung der Art verantwortlich sein. Es ermöglicht ihr auch noch im Hochsommer, während die meisten übrigen Arten ein ausgesprochenes Entwicklungspessimum aufweisen, eine gute Entwicklung.

5. Die optimale Lichtintensität liegt bei etwa 10 000 Lux. Unterhalb 250 Lux finden keine Zellteilungen mehr statt und die Zellen bleiben genau wie oberhalb 10 000 Lux unbeweglich. Die günstigste Energieverwertung liegt in dem Intensitätsbereich zwischen 500 und 5000 Lux.

6. Die Teilungsfrequenz der Zellen ist abhängig von der Lichtintensität und von der Zellgröße. 28 μ große Zellen teilen sich unter optimalen Temperatur- und Nährlösungsbedingungen bei 10 000 Lux in etwa 16-stündigen Intervallen. Kleinere Zellen teilen sich schneller, größere langsamer.

7. Im Gegensatz zu den meisten übrigen Diatomeen besitzt *Nitzschia palea* die Fähigkeit zu sekundärem Längenwachstum. Unter konstanten Versuchsbedingungen gehaltene Planktonkulturen lassen daher auch bei monatelanger Weiterzucht keine Größenabnahme der Zellen erkennen. Das sekundäre Längenwachstum steht offenbar in engem Zusammenhang mit der schwachen Verkieselung der Zellmembran.

8. Direktes Sonnenlicht sowie künstliche UV-Bestrahlung wirken auf *Nitzschia palea* in kurzer Zeit tödlich, und zwar auch dann, wenn durch Wasserkühlung dafür gesorgt wird, daß sich die Kulturen nicht über 25° C erwärmen. Die seit langem bekannte schädliche Wirkung, die das Sonnenlicht auf die Diatomeen ausübt, wird auf seinen UV-Gehalt zurückgeführt.

9. Normalerweise erfolgen die Zellteilungen ausschließlich im Licht; nur kräftig verfettete Zellen vermögen sich auf Grund ihrer Fettreserve auch im Dunkeln zu teilen.

10. Die Unbeweglichkeit der Zellen im Dunkeln ist auf eine Kontraktion der Protoplasten zurückzuführen, die auf diese Weise keinen unmittelbaren Kontakt mehr mit dem umgebenden Medium besitzen.

11. Außer dieser innerhalb kurzer Zeit eintretenden Protoplastenkontraktion tritt im Laufe eines längeren Dunkelaufenthaltes (24 bis 48 Stunden) auch noch eine auffällige Plastidenkontraktion ein, die gleichfalls am Licht innerhalb weniger Stunden vollständig reversibel ist.

12. Verfettung tritt stets dann ein, wenn die Zellteilungen unterdrückt werden, ohne daß gleichzeitig auch die Assimilation beeinträchtigt wird (Nährstoffentzug, Hemmstoffanreicherung). Sie ist von einem auffälligen Absinken des pH -Wertes der Nährlösung begleitet. Das Fett besitzt ausgesprochenen Reservestoffcharakter.

13. Die Sinkgeschwindigkeit der Zellen vermindert sich bei optimaler Verfettung von 15 bis 30 auf 0,1 bis 1 mm in der Minute. Die Trockenresistenz der Zellen ist von der Verfettung unabhängig: völlige Austrocknung hat unter allen Umständen den sofortigen Tod zur Folge.

14. Auf Grund ihrer großen ökologischen Valenz erweist sich *Nitzschia palea* als besonders geeignet für den Übergang von der benthonischen zur planktonischen Lebensweise. Daß sie in der Natur nicht als echter Plankter auftritt ist zweifellos lediglich auf ihr eine Kleinigkeit zu hohes spezifisches Gewicht zurückzuführen. Es ist jedoch von Interesse, daß in der Gattung *Nitzschia* neben etlichen reinen Grund- und Bodenformen bereits eine größere Anzahl echter Plankter vorkommt, sodaß diese Gattung unmittelbar die verschiedenen Stadien einer natürlichen Planktongenese vor Augen führt.

Literatur.

BARKER, H. A.: Photosynthesis in diatoms. Arch. Mikrobiol. **6**, 141 (1935). — BELJERINCK, M. W.: Das Assimilationsprodukt der Kohlensäure in den Chromatophoren der Diatomeen. Rec. trav. Bot. Néerl. **1**, 28 (1904). — BERNHAUER, K.: Mikrobiologische Fettsynthese. Erg. d. Enzymforschung **9**, 297 (1943). — BENECKE, W.: Über farblose Diatomeen der Kieler Förde. Jb. wiss. Bot. **35**, 535 (1900). — BRENDENFEL, L.: Über die Verbreitung der Erddiatomeen. Arch. f. Mikrobiol. im Druck. 1948.

V. DENFFER, D.: Über einen Wachstumshemmstoff in alternden Diatomeenkulturen. Biol. Zbl. **67**, 7 (1948). — DENK, V.: Der plasmolytische Grenzwert und seine praktische Bedeutung. Planta **32**, 630 (1942).

EINSELE, W.: Die Umsetzung von zugeführtem anorganischem Phosphat im eutrophen See und ihre Rückwirkung auf seinen Gesamthaushalt. Z. f. Fischerei u. d. Hilfsw. **39**, 407 (1941).

GEITLER, L.: Der Formwechsel der pennaten Diatomeen (Kieselalgen). Jena 1932. — GESSNER, F.: Die Planktonproduktion der Brackwässer in ihrer Beziehung zur Produktion der offenen See. Verh. Intern. Vern. Limnol. **6**, 154 (1934). — GISTL, R.: Zur Kenntnis der Erdalgen. Arch. Mikrobiol. **3**, 634 (1932).

HAMMERLING, J.: Entwicklung und Formbildungsvermögen von Acetabularia. Biol. Zbl. **51**, 633 (1931). — HARDER, R. und v. WITSCH, H.: Bericht über Versuche zur Fettsynthese mittels autotropher Mikroorganismen. Forschungsdienst, Sonderheft 16 (1942). — HARDER, R. und v. WITSCH, H.: Über

Massenkultur von Diatomeen. Ber. D. Bot. Ges. **60**, 146 (1943). — HÖFLER, K.: Aus der Protoplasmatik der Diatomeen. Ber. D. Bot. Ges. **58**, 97 (1940). — HUBER-PESTALOZZI, G.: Das Phytoplankton des Süßwassers, Tl. 1 und 2. Die Binnengewässer Bd. XVI, Stuttgart 1942. — HUSTEDT, FR.: *Thalassiosira fluviatilis* nov. spec., eine Wasserblüte im Wesergebiet. Ber. D. Bot. Ges. **43**, 565 (1925). — HUSTEDT, FR.: Die Kieselalgen Deutschlands, Oesterreichs und der Schweiz. Rabenhorst Kryptogamenflora, Bd. 7, 1. Teil, Leipzig 1930a. — HUSTEDT, FR.: Bacillariophyta (Diatomeen), in Paschers Süßwasserflora Mitteleuropas, 2. Aufl., H. 10, Jena 1930b.

KARSTEN, G.: Die Diatomeen der Kieler Bucht. Wiss. Meeresunters. N. F., Bd. 4, Kiel 1899. — KARSTEN, G.: Über farblose Diatomeen. Flora **89**, 404 (1901). — KETCHUM, B. H. und REDFIELD, A. C.: A method for maintaining a continuous supply of marine diatoms by culture. Biol. Bull. **75**, 165 (1938). — KOLBE, R. W.: Zur Ökologie, Morphologie und Systematik der Brackwasserdiatomeen. Pflanzenforschung, Heft 7, 1927. — KOLBE, R. W.: Grundlinien einer allgemeinen Ökologie der Diatomeen. Ergebn. d. Biol. **8**, 222 (1932). — KOLBE, R. W.: Referat über L. Geitler: Der Formwechsel der pennaten Diatomeen. Bot. Zbl. **165**, 106 (1933). — KOLKOWITZ, R.: Über die Ursachen der Planktonentwicklung im Lietzensee. Ber. D. Bot. Ges. **32**, 639 (1914). — KÜSTER, E.: Die Pflanzenzelle, Jena 1935. — KÜSTER, E.: Pathologie der Pflanzenzelle, Teil 2. Pathologie der Plastiden. Protopl. Monogr., Bd. **13**, Berlin 1937. — KÜSTER, E.: Austrocknungsercheinungen und Kohäsionsbewegungen bei Diatomeen. Mitt. Bot. Inst. Gießen **1**, 1 (1946).

LENZ, F.: Einführung in die Biologie der Süßwasserseen. Berlin 1928.

MERKER, E.: Der Lichtschutz im belebten Wasser. Int. Rev. ges. Hydrobiol. **40**, 174 (1940). — MERKER, E.: Lichtgefahr und Tierwelt. Der Biologe **9**, 272 (1940). — MÜLLER, O.: Das Gesetz der Zellteilungsfolge von *Melosira* (*Orthosira*) *arenaria*. Moore. Ber. D. Bot. Ges. **1**, 35 (1883).

NAUMANN, E.: Über einige besonders auffallende Hochproduktionen aus Nannoplankton im Süßwasser. Ber. D. Bot. Ges. **37**, 40 (1919).

ONDRATSCHEK, K.: Über das Wirkstoffbedürfnis heterotropher Algen, 1. Mitt. Arch. Mikrobiol. **11**, 239 (1940).

PRINGSHEIM, E. G.: Algenkultur. Handb. d. Biol. Arb. method. **11/2**, 377 (1924). — PRINGSHEIM, E. G.: Das Rätsel der Erdabkochung. BBC. Abt. A. **55**, 100, (1936).

RICHTER, O.: Zur Physiologie der Diatomeen. 1. Mitt. Sitz.-Ber. Kais. Akad. Wiss. Wien. Math.-nat. Kl. **115**, Abt. 1, 27 (1906). — RIPPEL, A.: Wachstumsgesetze bei höheren und niederen Pflanzen. Naturw. u. Landw., H. 3, Freising-Münch. 1925. — RIPPEL, A.: Das Ertragsgesetz. Handb. d. Pfl. Ern. und Düngerlehre, Bd. 1, 602 (1931). — RIPPEL-BALDES, A.: Grundriß der Mikrobiol., Berlin u. Göttingen. (1947). — RUTTNER, F.: Grundriß der Limnologie (Hydrobiologie des Süßwassers). Berlin. 1940.

THIENEMANN, A.: Der Nahrungskreislauf im Wasser. Verh. d. Zool. Ges. **31**. Jahresvers. z. Kiel. 29 (1926).

UTERMÖHL, H.: Limnologische Phytoplanktonstudien. Die Besiedlung ostholsteinischer Seen mit Schwebepflanzen. Arch. Hydrobiol. Suppl. Bd. V, 1. 1925. — UTERMÖHL, H.: Untersuchungen über den Gesamtplanktongehalt des Kanarenstromes. Arch. Hydrobiol. **18**, 464 (1927).

WIEDLING, St.: Die Gültigkeit der Mac-Donald-Pfitzerschen Regel bei der Diatomeengattung Nitzschia. Nautrw. **31**, 115 (1942). — v. WITSCH, H.: Physiologischer Zustand und Wachstumsintensität bei Chlorella. Arch. Mikrobiol. **14**, 128 (1948).

(Aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen.)

Über das Vorkommen verschiedener Rassen von *Aspergillus niger* van Tiegh. im Boden.¹

Von

I. PETERS und A. RIPPEL-BALDES.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 5. Januar 1948.)

Frühere Untersuchungen des einen von uns² hatten ergeben, daß *Aspergillus niger* van Tiegh. innerhalb Deutschlands im Süden häufiger ist als im Norden. Dazu hatte sich aus einigen tropischen Böden eine Rasse ergeben, die bei höherer Temperatur nur Sklerotien bildet, keine Konidien, bei niedriger Temperatur das umgekehrte Verhalten zeigt. Auch war aufgefallen, daß in tropischen und gewissen süddeutschen Böden eine Rasse vorherrschte, die sich durch besonders üppige Bildung von Konidien von sehr dunkler Farbe, bei dünner Myceldecke auszeichnet. Daraus ergab sich die Fragestellung, welche Rassen morphologischer und physiologischer Art in einheimischen Böden vorhanden seien.

Die Methodik war die gleiche, wie sie bei den früheren Untersuchungen benutzt wurde, nämlich Verwendung der elektiven Tannin-Nährlösung: 20% Tannin, 0,5% Rohrzucker (um das Anwachsen etwas zu beschleunigen), 1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,25% KH_2PO_4 , 0,125% MgSO_4 , 0,005% ZnSO_4 . 25 ccm Nährlösung in 100er Erlenmeyerkölbchen. Temperatur 27° C. Beobachtungszeit, wenn nicht anders angegeben, 23 Tage. Die Bodenproben vom Lutertal (s. später) wurden mit einem Glasröhrchen steril entnommen und in trocken sterilisierte Kölbchen gebracht; im Institut wurde die sterile Nährlösung hinzugefügt. Durch Markierung des Glasröhrchens konnte je etwa 1 g Boden entnommen werden. Von den übrigen Bodenproben wurde je 1 g in die Kölbchen mit der Nährlösung gebracht.

Mikroverteilung des Pilzes.

Zunächst interessierte uns die Mikroverteilung des Pilzes, die auf einem steinigen Steilhang des Lutertales bei Göttingen (linke Talseite unmittelbar oberhalb von Hoffmannshof) festgestellt wurde. Der Hang besteht aus mittlerem Muschelkalk, besitzt Nord-Ost-Lage und war seit 3 Jahren nicht landwirtschaftlich genutzt. Er trug eine geschlossene Grasnarbe und diente vorher als Schafweide. Es handelt sich also mehr oder weniger um einen Na-

¹ Auszug aus der Dissertation: ILSE PETERS: Untersuchung über die natürliche Verbreitung und die Eigenschaften der verschiedenartigen Stämme von *Aspergillus niger*. Dissertation Göttingen, mathematisch-naturwissenschaftliche Fakultät, 1946.

² A. RIPPEL: Diese Zeitschr. 11, 1, 1940.

turboden, soweit ein solcher bei uns noch zu finden ist. Auf einer Fläche von 150 m Breite und 50 m Höhe wurden im Netzabstand von je 10 m je 2 Proben entnommen. In der Mitte dieser Fläche wurde weiterhin ein Quadrat von 10 m Seitenlänge abgesteckt, und dort wurden in je 1 m Netz-

1	●	●	×	●	●	●	●	●	●	10
11	●	●	●	●	●	●	●	●	×	20
21	●	●	●	●	●	×	●	●	×	30
31	●	●	×	●	●	●	●	●	●	40
41	●	●	⊗	×	●	●	●	●	●	50
51	⊗	●	●	⊗	⊗	×	●	●	×	60
61	●	●	●	●	●	●	●	●	●	70
71	×	●	●	●	●	●	●	●	●	80
81	●	●	×	●	●	●	●	●	●	90
91	×	●	●	●	●	●	●	●	●	100

Abb. 1. Mikroverteilung von *Aspergillus niger*. Quadrat von 1 m Seitenlänge; Abstand der Punkte je 10 cm. Die Nummern bedeuten die Einzelproben. Ein ● bedeutet Probeentnahme ohne Pilzwachstum. Ein × bedeutet Entwicklung nur in 1 der beiden Parallelkulturen, ein ⊗ Entwicklung in beiden. Die Punkte der Probenahme sind von links nach rechts nummeriert.

abstand in gleicher Weise je 2 Proben entnommen. Endlich wurde in der Mitte dieser 10-m-Fläche ein Quadrat von 1 m Seitenlänge abgesteckt, in dem im Netzabstand von je 10 cm die Proben in gleicher Weise entnommen wurden.

Es ergab sich dabei, daß der Pilz in kleineren Nestern regellos verteilt ist; als Beispiel ist in Abb. 1 die Verteilung in der kleinsten Fläche von 1 m Seitenlänge gegeben, in der also die Proben im Netzabstand von je 10 cm entnommen waren. Dort wäre ein Zusammenhang der bei den Punkten 33, 43, 54, 55, 56 gefundenen Stämme denkbar. Aber nur 33, 43, 44 stimmten in ihren morphologischen Merkmalen überein (mäßige Sporulation, reichliche Sklerotienbildung), während 54 und die eine Parallelprobe von 55 ganz anders aussahen (gute Sporulation, mit sehr zarten Konidien, keine Sklerotien) und endlich die 2. Parallele von 55 wieder einen anderen Typus zeigte. Daraus geht hervor, daß im Boden zusammenhängendes Mycel einer Rasse nur eine Ausdehnung von etwa 15 cm hat. Die Verteilung des Pilzes auf den größeren Probeflächen zeigte das gleiche unregelmäßige Bild, wie es von der kleinsten Fläche geschildert wurde.

Morphologische Rassen.

Aus den eben mitgeteilten Beobachtungen hat sich schon ergeben, daß lokal verschiedene Rassen des Pilzes vorkommen können, sogar

in den Parallelproben von der gleichen Stelle. Sogar in einem Kolben entwickelten sich aus dem 1 g eingimpften Bodens in einigen Fällen bis zu 3 verschiedene Mycelien. Es erscheint zwecklos, alle Einzelheiten zu beschreiben. Als wesentlichstes ergab sich folgendes: in Süddeutschland, vornehmlich in typischen Trockenrasen (Kaiserstuhl bei Freiburg, Tübingen, schwäbische Alb bei Beuron, Garchinger Heide bei München) herrscht die eingangs erwähnte Form vor mit dünner, leicht gefalteter Decke, die von dicht stehenden rußschwarzen Konidien bedeckt ist und kein wolliges Luftmycel zeigt. Derartige Kulturen ergaben sich auch aus Böden von Prag, vom Dnjestr, aus Ungarn und aus Dalmatien, ganz ausgesprochen aber aus tropischen Böden (Java, Ost- und Westafrika, Mittelamerika). Z. B. ist in den Protokollen ausdrücklich vermerkt, daß Kulturen aus Tübingen genau so aussahen wie solche aus Java. Man kann diese Form also als eine südliche Form ansprechen, wobei noch unbestimmt bleibt, welche Bedingungen für das Vorherrschen entscheidend sind, Wärme, Trockenheit oder ein anderer Faktor. Auf die Sklerotienbildung wird gleich noch zurückzukommen sein.

Ganz anders sehen die Stämme aus, die vorwiegend in Süddeutschland in Wäldern und in höheren Lagen, namentlich in Rohhumusböden, sowie in Mittel- und Norddeutschland auftreten: Das Mycel ist hier stark gefaltet und nur inselhaft mit Sporen besetzt; dazu tritt weißes oder bräunliches Luftmycel, teilweise in starker Ausbildung, auf. Am besten werden die Verhältnisse durch die Abb. 2 erläutert, die

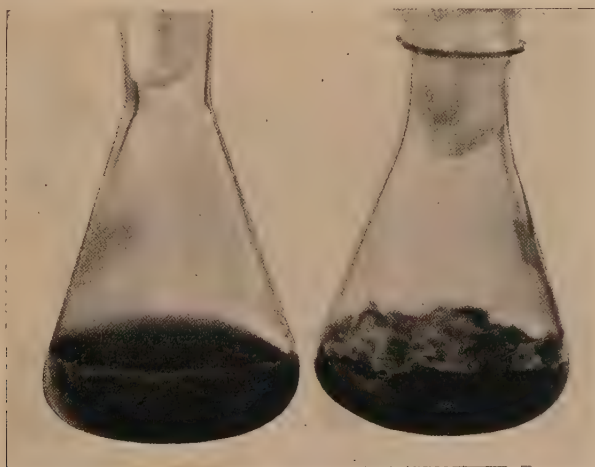


Abb. 2. *Aspergillus niger*: Links Kultur vom Kaiserstuhl, rechts vom Brocken; beide auf Tannin-Nährlösung.

links eine Kultur vom Kaiserstuhl, rechts eine solche vom Brocken zeigt.

Ein Fall sei noch erwähnt: Auf einer Tannin-Kultur einer Probe des Luttertals erschien in sporenbesetztem Mycel ein sporenloser Sek-

tor mit wattigem, graubraunem Luftmycel. Bei Weiterimpfung blieb dieser „Mycelstamm“ konstant. Er zeichnete sich unter den Neuisolierungen durch besonders geringe Bildung von Oxalsäure aus (vergl. Tab. II unter der Bezeichnung 71 bx (!)).

Besonderes Interesse bot das Auftreten von „Sklerotien-Stämmen“ wie sie vordem nur aus den Tropen bekannt waren³. Von 25 mit je 1 g einer Bodenprobe vom Wilseder Berg (Lüneburger Heide) geimpften Kolben ergaben 16 Entwicklung einer einheitlichen Rasse, deren Mycel bereits am 1. Tage des Auftretens mit kleinen weißen Knötchen bedeckt war, die sich später zu dicht stehenden, oft zu 3 miteinander verwachsenen Sklerotien entwickelten. Ebenso wurden vom Luttertale einige Stämme mit reiner Sklerotienbildung isoliert. Unter „Sklerotien-Stämmen“ sind dabei solche zu verstehen, deren Decke mit Sklerotien übersät ist, bei völliger oder doch fast völliger Zurückdrängung der Sporenbildung. Vereinzelte Sklerotien finden sich dagegen häufig. Der Anteil der Sklerotienmasse am Mycel kann bei den Sklerotienstämmen sehr hoch sein und betrug z. B. in einem Falle (Wilseder, Normallösung⁴ 270 C) 83 %.

Bemerkenswert ist nun, daß die Luttertaltstämme nach 4-maliger Überimpfung auf Würzeschrägagar die Fähigkeit zur Sklerotienbildung völlig verloren, während die Wilseder Stämme nach 2 Jahren und ein früher beschriebener tropischer Stamm noch nach 8 Jahren diese Fähigkeit unverändert zeigten, beide bei gleicher Überimpfung auf Würzeschrägagar. Dabei sei noch erwähnt, daß dieser tropische Stamm, Ende Februar 1944 in den Garten des Instituts an markierter Stelle eingebracht (wobei natürlich eigens darauf geprüft war, daß in diesem Boden keine Sklerotien-Stämme, wohl aber Konidien-Stämme vorhanden waren), sich im Laufe von 22 Wochen etwa 8 cm im Boden ausgebreitet hatte. Eine weitere Prüfung Ende März 1948 ergab immer noch das Vorhandensein dieses Pilzstammes, der also über 4 Jahre im Boden lebend geblieben war, eine Zeit, in die der abnorm kalte Winter 1946/47 fiel. Damals betrug die tägliche Lufttemperatur vom 25. Januar bis 21. Februar 1947 im Minimum — 7.0 bis — 19.0° C, meist unter — 10.0° C. Die tägliche Maximaltemperatur bewegte sich zwischen — 1.0 und — 8.0° C, blieb also immer unter 0°. Dieser tropische Stamm zeigte also ein erstaunliches Anpassungsvermögen an Kälte.

Jedoch zeigte der oben erwähnte einheimische Wilseder-Stamm als Temperaturminimum für die Sklerotienbildung, die ja durch höhere Temperatur begünstigt bzw. erst ermöglicht wird⁵, 21° C, während es für den tropischen Stamm sich zu 26° C ergab. In dieser Eigenschaft spiegelt sich also die Anpassung an die natürlichen klimatischen Bedingungen noch deutlich wieder.

³ Siehe Abbildung 91, S. 254 bei A. RIPPEL-BALDES: Grundriß der Mikrobiologie, Springer-Verlag, Berlin und Göttingen, 1947.

⁴ Normallösung: 10 % Rohrzucker, 1.29 % NaNO₃, 0.25 % KH₂PO₄, 0.125 % MgSO₄, 0.005 % ZnSO₄, Dest. Wasser, Anfangs-pH-Wert 4.5.

⁵ Vergl. A. RIPPEL, l. c.

Physiologische Rassen.

Im Gegensatz zur morphologischen Erscheinung, die wenigstens eine gewisse Standortbeziehung ergeben hatte, war wider Erwarten eine solche in physiologischer Hinsicht nicht nachzuweisen, wie Versuche über die Bildung von Zitronen- und Oxalsäure zeigten. Insbesondere hoben sich die morphologisch typischen Süd-Stämme (Kaiserstuhl usw.) in keiner Weise unter den anderen hervor. Auch bestand keine durchgreifende Beziehung zwischen der Menge der beiden von einem Stamm gebildeten Säuren, obwohl Tabelle II zeigt, daß etwa in der Hälfte der Fälle gute Zitronensäurebildner auch gute Oxalsäurebildner sind und schlechte Zitronensäurebildner auch schlechte Oxalsäurebildner.

Offenbar sind die Ursachen des Verlaufs der Säurebildung zu komplex, um von dieser Fragestellung aus erfaßt werden zu können. Eine bemerkenswerte Tatsache ergab sich indessen mit aller Deutlichkeit. Indem zur Untersuchung eine Reihe von Stämmen herangezogen wurde, die vor 8 Jahren isoliert und seitdem im Institut aus Würzeschrägagar weiter gezogen worden waren, zeigte sich, daß die Säurebildung der Stämme im Laufe der Jahre zurückgegangen war, eine in der Technik allgemein bekannte Erscheinung⁶, die hier aber faßbarer nachzuweisen war. Im übrigen sei bemerkt, daß die physiologischen und morphologischen Eigenschaften der neu isolierten Stämme sich während einer etwa 2 Jahre dauernden Kulturzeit noch nicht geändert hatten, bis auf den oben erwähnten Fall der Sklerotienbildung.

Zum Vergleich wurden 15 altisolierte und 35 neuisolierte Stämme herangezogen, an denen in der oben angegebenen Normallösung (40 ccm in 100er Erlenmeyerkölbchen, 27° C)⁷ die Bildung von Zitronen- und Oxalsäure, jeweils nach 10, 12, 14 und 30 Tagen untersucht wurde. Wegen der ständigen Veränderung der Säurewerte während der Kulturdauer ist ein solcher Vergleich nicht einfach. Bei den in Tabelle I angezogenen Zahlen wurde folgender Weg eingeschlagen: Es wurden für jedes Wachstumsstadium und jede Säure die jeweils 10 schlechtesten und besten Stämme aufgenommen, bei 4 Wachstumsstadien und 2 Säuren ergibt sich also die Zahl 10 mal 4 mal 2 = 80. Man sieht, daß die maximalen Säurewerte völlig auf Seiten der Neuisolierungen liegen (76 gegen nur 4 bei den Institutsstämmen). Bei den Niedrigstwerten verwischen sich die Verhältnisse etwas, wie verständlich ist. Immerhin stehen umgekehrt die Institutsstämme mit 49 erheblich über den Neuisolierungen mit 31. Berücksichtigt man, daß etwas mehr als das Doppelte von Neuisolierungen untersucht wurde im Vergleich zu den Institutsstämmen (35 gegen 15), so würden die Verhältnisse, bei gleicher Zahl, zweifellos für die Niedrigstwerte noch erheblich klarer werden müssen, da der Anteil der Neuisolierungen steigen müßte, während für

⁶ W. SCHWARTZ und H. LANG: Diese Zeitschr. 5, 387, 1934; T. PALEY: Ebenda 7, 206, 1936.

⁷ Alle angegebenen Werte beziehen sich auf diese Temperatur; bei veränderter Temperatur ändern sie sich natürlich.

Tabelle I. Zahlenmäßige Verteilung der jeweils 10 Stämme von *Aspergillus niger* mit niedrigster und höchster Säurebildung während des Wachstumsverlaufs

	Tage Kulturdauer								
	10		12		14		30		Zu- samm
	Zitr.	Ox.	Zitr.	Ox.	Zitr.	Ox.	Zitr.	Ox.	
Niedrigste Säurebildung									
Institutsstämme	7	7	6	7	5	8	5	4	49
Neuisolierungen	3	3	4	3	5	2	5	6	31
Höchste Säurebildung									
Institutsstämme	1	1	0	0	1	0	1	0	4
Neuisolierungen	9	9	10	10	9	10	9	10	76

Zitr. = Zitronensäure; Ox. = Oxalsäure.

die Höchstwerte, nach obigen Zahlen, keine besondere Verschiebung zu erwarten wäre.

In Tabelle II sind tatsächlich erzielte Säurewerte angegeben. Sie stellen das Mittel aus den 4 Wachstumsstadien für jeden Stamm dar und zwar sind wiederum die jeweils 10 Stämme mit niedrigster und höchster Säurebildung genommen. Auch diese Zahlen zeigen das gleiche Bild, wie es eben besprochen wurde, und es brauchen keine weiteren Ausführungen dazu gegeben zu werden. Die Neuisolierungen sind durch ein + gekennzeichnet. Wie man sieht, sind sie, bis auf den Stamm Göttingen „Alt“ für Zitronensäure, quantitativ als kräftigste Säurebildner vertreten. Umgekehrt erscheinen sie unter den niedrigsten Säurebildnern nur als der oben erwähnte „Mycelstamm“, 71 bx (!) für Oxalsäure und 2 Stämme, 42 ax und 12 bx, für Zitronensäure; aber diese beiden Stämme stehen in ihrer Gruppe wieder als beste Zitronensäurebildner. Würde man die Gegenüberstellung von je 10 auf je 10 Stämme erhöhen, so würde das Bild das gleiche bleiben: Bei den Höchstwerten erscheint dann kein Stamm der Alt-Isolierungen, während für die Niedrigstwerte 2 Neu-Isolierungen für Zitronensäure und 1 für Oxalsäure hinzukämen. Die in der Tabelle ebenfalls angegebenen pH-Werte runden das Bild ab. Dabei wurde der Wert für das letzte Wachstumsstadium angegeben.

Endlich gibt Tabelle III eine letzte Übersicht, in der oben die Durchschnittswerte der Niedrigst- und Höchstwerte aus Tabelle II, umten die Gesamtdurchschnittswerte aus allen Wachstumsstadien der alten Institutsstämme und der Neuisolierungen angegeben sind. Wie man sieht, treten auch hier alle gekennzeichneten Unterschiede mit der Überlegenheit der Neuisolierungen in der Säurebildung hervor. Daß der Unterschied zwischen Niedrigst- und Höchstwerten (in der Tabelle III in % ausgedrückt) stärker ist als zwischen Alt- und Neu-Isolierungen bei deren Gesamtdurchschnitt, ist natürlich verständlich.

Aber die verschiedenartige Betrachtung der gewonnenen Zahlen zeigt, daß es sich um eine tatsächlich vorhandene Erscheinung handelt.

Tabelle II. Säure-Mittelwert aus den 4 Wachstumsstadien der jeweils 10 Stämme mit niedrigster und höchster Säurebildung von *Aspergillus niger*.

Stamm	p _H -Wert	Zitronensäure g/100 ccm	Stamm	p _H -Wert	Oxalsäure
Niedrigstwerte					
<u>44^I</u>	6,4	60,4	<u>55</u>	9,1	184,9
<u>51</u>	7,5	61,3	<u>Göttingen „Alt“</u>	7,1	305,0
<u>55</u>	9,1	73,7	<u>178</u>	7,0	312,3
<u>Göttingen „Neu“</u>	7,6	77,2	+ <u>71b x (!)</u>	8,0	332,8
<u>178</u>	7,0	108,0	<u>51</u>	7,5	337,0
<u>168</u>	6,9	124,4	<u>168</u>	6,9	352,0
<u>321</u>	8,1	140,3	<u>52</u>	6,7	358,0
<u>44a</u>	7,1	142,9	<u>321</u>	8,1	370,8
+ <u>42a x</u>	6,8	143,1	<u>44^I</u>	6,4	375,0
+ <u>12b x</u>	3,7	154,3	<u>44B^I</u>	6,4	389,8
Höchstwerte					
+ <u>60b xxx</u>	3,8	497,3	+ <u>Brocken</u>	3,9	949,1
+ <u>Brocken</u>	3,9	462,8	+ <u>Prag</u>	3,7	866,1
+ <u>74b x</u>	6,5	396,5	+ <u>Edendorf</u>	3,3	855,2
<u>Göttingen „Alt“</u>	7,1	376,8	+ <u>71b x</u>	4,8	853,8
+ <u>Pfalz</u>	4,9	376,7	+ <u>Mecklenburg</u>	4,0	845,3
+ <u>39b xx</u>	3,8	373,5	+ <u>Salzwedel</u>	3,4	826,6
+ <u>86a xx</u>	6,8	351,0	+ <u>18a x</u>	3,9	798,0
+ <u>Mecklenburg</u>	4,0	333,1	+ <u>41a x</u>	4,1	783,3
+ <u>Salzwedel</u>	3,4	330,7	+ <u>39b xx</u>	3,8	771,5
+ <u>Birkenfeld</u>	4,3	330,7	+ <u>60b xxx</u>	3,8	759,4

Ein + bedeutet Neuisolierungen. Unterstrichene Zahlen: Die betreffenden Stämme haben Niedrigst- bzw. Höchstwerte für beide Säuren. Stamm 71b x (!) ist der oben erwähnte „Mycelstamm“.

delt. Hierzu sei noch auf folgende Beobachtung hingewiesen: Die beiden alten Instituts-Stämme „Göttingen Alt“ und Göttingen Neu“ unterschieden sich in früheren Untersuchungen von BEHR⁸ in der Hinsicht, daß der Stamm „Alt“ in Nitrat-Nährlösung „neutrale Autolyse“ zeigte, d. h. nach einiger Zeit war der p_H-Wert auf 6,7 gestiegen, und die Nährlösung war schwarzbraun verfärbt. Bei Stamm „Neu“ hingegen wurde nur ein p_H-Wert von 3,3 erzielt, und die Nährlösung färbte sich lediglich gelblich. Die Ursache war bei Stamm „Neu“ die starke Bildung von Oxalsäure, die offenbar nicht verarbeitet wurde. Bei den vorliegenden Untersuchungen wurde jedoch auch bei diesem Stamm die Nährlösung braun, der p_H-Wert stieg bei beiden Stämmen auf etwas

⁸ G. BEHR: Diese Zeitschr. 1, 418, 1930.

Tabelle III. *Durchschnittliche Säurewerte.*

	Niedrigstwerte		Höchstwerte	
	Zitronensäure	Oxalsäure	Zitronensäure	Oxalsäure
Von je 10 Niedrigst- und Höchstwerten	108,5	331,8	382,9	830,8
Niedrigstwerte in % der Höchstwerte	28,4	39,9		
	Altisolierungen		Neuisolierungen	
Gesamtdurchschnitt aller Werte	154,3	407,1	260,5	633,9
Altisolierungen in % der Neuisolierungen	59,2	64,2		

über 7 (7.1 für „Alt“, 7.6 für „Neu“). Aber auch jetzt noch bildete *Stamm „Neu“* mehr als doppelt so viel Oxalsäure verglichen mit *Stamm „Alt“*, hatte diese Eigenschaft also noch bis zu einem gewissen Grade beibehalten.

Es scheint, daß der Rückgang der Säurebildung in Kultur sich stärker auf die Zitronensäure erstreckt als auf die Oxalsäure, wie die %igen Zahlen der Tabelle III zeigen. Immerhin müßte dieser Vorgang aber noch genauer verfolgt werden. Auch über die Ursachen des Säurerückgangs kann in diesem Zusammenhang natürlich nichts ausgesagt werden.

Zur Gewinnung geeigneter Zitronensäure-Stämme für die Technik ergibt sich schließlich noch eine einfache Methodik: Mit Hilfe der oben beschriebenen Tannin-Elektivkultur lassen sich jederzeit aus Boden *Aspergillus niger*-Stämme in kürzester Zeit isolieren, von denen die mit bester Zitronensäurebildung ausgewählt werden können. Für den Fang des Pilzes ist man also von der zufälligen Auffindung auf beliebigen anderen Nährböden, mit der massenhaften Entwicklung anderer Pilze, völlig unabhängig.

Zusammenfassung.

In Süddeutschland, namentlich in Trockenrasen, bis zu den Tropen ist eine Rasse von *Aspergillus niger* verbreitet, die sich durch dünne, leicht gewellte Myceldecken mit sehr reichlicher Sporenbildung auszeichnet, während dort in höheren Lagen, in Wäldern sowie in Mittel- und Norddeutschland Formen auftreten, bei denen die Sporenbildung lückenhaft ist und Luftmycel mehr oder weniger stark in Erscheinung tritt.

In Deutschland aufgefundene, vorher nur aus den Tropen bekannte reine Sklerotien-Stämme verloren die Eigenschaft der Sklerotienbildung entweder nach wenigen Überimpfungen oder zeigten ein niedrigeres

Temperaturminimum für die Bildung der Sklerotien als die tropischen Sklerotienbildner.

Unterschiede in der Säurebildung nach der Herkunft der Stämme ergaben sich nicht. Doch unterschieden sich Neuisolierungen aus Boden durch höhere Säurebildung von seit Jahren im Institut gehaltenen Kulturen, die offenbar einen Rückgang in dieser Fähigkeit erfuhren.

Auf die Nützlichkeit der Tannin-Elektivkultur zur schnellen Gewinnung von *Aspergillus niger*-Stämmen und zur Auswahl geeigneter Zitronensäurebildner für die Technik wird hingewiesen.

(Aus den Botanischen Anstalten in Göttingen.)

Über niedere Bodenphycomyceten.

Von

ELLEN REMY.

Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 10. Januar 1948.)

Nicht wenige der niedersten *Phycomyceten* sind seit ihrer Entdeckung kaum wiedergefunden worden. HARDER kam daher auf den Gedanken, daß sie vielleicht in den Tropen, die naturgemäß noch weniger durchforscht sind als die Gebiete mit gemäßigttem Klima, häufiger sein könnten. Er hat deshalb auf einer Reise nach Westindien zahlreiche Erdproben gesammelt und außerdem Angehörige der Handelsmarine veranlaßt, gleiches in anderen tropischen Gebieten zu tun. Das gesamte Material hat er durch SÖRGEL untersuchen lassen, wobei SÖRGEL (1941) zahlreiche niedere *Phycomyceten* aus den Bodenproben herauskultivieren konnte. Die guten Erfolge SÖRGELS gaben den Anlaß, nun auch an deutschen Böden systematische Untersuchungen über die *Phycomyceten*flora anzustellen und zu prüfen, ob sich im Auftreten und in der Verteilung der einzelnen Gattungen, besonders der niederen, früher vielfach als besonders selten angesehenen Formen, eventuell ein ähnliches Bild wie bei den tropischen Böden ergibt. Das ist das Hauptziel der vorliegenden Arbeit. Daneben soll über einige Laboratoriumsversuche mit den isolierten Pilzen über ihre Resistenz gegen Außenfaktoren berichtet werden.

I. Methodik.

Für die systematischen Untersuchungen wurden insgesamt 144 Erdproben aus verschiedenen Gegenden Deutschlands beschafft. Die Erdproben wurden in Glasröhrchen, die mit einem paraffinierten Korkstopfen verschlossen waren, gesammelt, und zwar erfolgte die Entnahme stets von der Erdoberfläche, da tiefere Bodenschichten bei SÖRGEL keine Unterschiede in ihrem Pilzvorkommen zeigten. Nach dem Einsammeln der Proben wurden diese sogleich im Laboratorium mehrmals (meist viermal) angesetzt (s. unten), und diese Ansätze nach gewissen Zeitabständen noch zweimal wiederholt, so daß meist 12 Ansätze von jeder Probe vorgenommen wurden. So wurde z. B. eine Probe am 15. IX. 44, am 8. I. 45 und am 17. II. 45 jedesmal viermal angesetzt. Die Untersuchungen erstreckten sich wegen der Menge des Materials meist zwangsweise auf diese Zeitabstände.

„Angesetzt“ wurden die Erden folgendermaßen: Ungefähr 1 cm aus jeder Probe wurde in eine sterile Petrischale gebracht und mit abgekochtem Leitungswasser übergossen, so daß sich eine etwa 1 cm hohe Wasserschicht über der Erde befand. Mit einem Spatel, der jedesmal kurz abgeflammt wurde, wurde die Erde mit dem Wasser gut verrührt. In das Wasser wurden Köder gelegt, auf denen sich die Pilze ansiedeln sollten. Als Köder dienten: abgetötete Stubenfliegen, Hanfsamen, Grasstückchen, Strohstückchen und Ameisenpuppen; sie alle wurden vor dem Einbringen in die Petrischale im Dampftopf sterilisiert. Außerdem wurden sterilisierte und auch lebende Pollenkörner von *Pinus* verwendet; letztere wurden erst relativ spät als günstige Objekte zum Einfangen von *Chytridiaceen*, vor allem *Rhizophidium pollinis*, erkannt, so daß leider nicht bei sämtlichen Ansätzen Pinuspollen verwendet wurde.

Mit den verschiedenen Ködern gelingt es unschwer, eine Reihe von niederen *Phycomyceten* aus dem Erdboden zu isolieren, wenn auch wohl nicht alle Arten wirklich restlos mit ihnen erfaßt werden; denn es dürfte wohl bestimmt Formen geben, die nicht ohne weiteres die ausgestreuten Köder befallen. Man wird daher immer wieder versuchen müssen, noch weitere günstige Köder zum Einfangen der niederen *Phycomyceten* zu finden. Es wurden auch noch verschiedene Objekte ausprobiert, wie Blattstückchen, kleine Zweigstücke und verschiedene Maden, jedoch waren sie nicht besser geeignet als die anderen; es wurden auf ihnen auch immer nur die gleichen Gattungen gefunden wie auf den anderen Ködern.

Die Schalen standen bei Zimmertemperatur auf einem Tisch im Hintergrund des Arbeitsraumes, um eine stärkere Algenentwicklung möglichst zu verhindern. Höhere Temperaturen, die für die Schnelligkeit des Pilzwachstums wohl günstiger gewesen wären (vgl. unten S. 230), verursachten eine ziemlich starke Bakterienentwicklung. Da es bei diesen Untersuchungen lediglich darauf ankam, die Pilze überhaupt aus der Erde herauszukultivieren, war Zimmertemperatur hierzu am besten geeignet.

Schon nach wenigen Tagen waren die ersten zarten Rasen von *Pythium* und von *Saprolegniaceen* sichtbar, auch *Mucoraceen* entwickelten sich ziemlich rasch. Formen wie *Nowakowskiella*, *Rhizophlyctis* und *Rhizophidium* konnte man deutlich erst nach 6—8 Tagen erkennen. Die Schalen wurden etwa 2—4 Wochen lang beobachtet; meist traten aber bereits nach 14 Tagen außer höheren Pilzen keine neuen Formen mehr auf. Das Ansetzen der Proben in Petrischalen ist deshalb praktisch, weil es ein direktes Beobachten der Objekte unter dem Mikroskop gestattet. Blindproben, bei denen Petrischalen offen im Raum stehen gelassen wurden, zeigten niemals Pilzentwicklung; man kann die Schalen daher unbedenklich in geöffnetem Zustand durchmikroskopieren. Zum genauen Bestimmen wurden die Pilze dann allerdings auf den Objektträger übertragen.

Die Bestimmung beschränkte sich meist auf die Feststellung der Gattungen. Zur Erkennung der Arten fehlte leider oft die dafür notwendige Literatur. Die Pilze wurden nach WINTER (1892), VON MINDEN (1915), FITZPATRIK (1930) und COKER (1923) bestimmt. Das Buch von SPARROW (1943), in dem auch die in neuerer Zeit gefundenen Arten enthalten sind, wurde mir leider erst nach Abschluß des experimentellen Teils der Arbeit zugänglich.

Für die physiologischen Versuche war es notwendig, die Pilze in artreine Kultur zu bringen. Das gelang bei einer Anzahl von ihnen verhältnismäßig leicht durch Abfangen von Zoosporen (vgl. COUCH 1939). So wurde bei *Rhizophidium pollinis* ein mit dem Pilz bewachsenes *Pinus*-Pollen-

korn in einen hängenden Tropfen übertragen, wo der Pilz bald Schwärmer bildete. Die Schwärmer wurden mit einer Kapillare in eine neue Schale mit sterilisiertem Leitungswasser und frischen Pollen übertragen. Wiederholt man diesen Vorgang mehrmals, so hat man mit Sicherheit eine artreine Kultur des Pilzes. *Rhizophlyctis rosea* befand sich in unseren Kulturen meist an Grasstückchen, *Nowakowskiella elegans* meist an Strohstückchen; auch bei ihnen wurde einfach unter dem Mikroskop ein Teil aus dem Gras- bzw. Strohstück, auf dem ein Sporangium des Pilzes wuchs, abpräpariert, in einen hängenden Tropfen gebracht, und die sich bildenden Schwärmer wieder abgefangen und übertragen. *Allomyces*, *Thraustotheka*, *Dictyuchus*, *Saprolegnia*, *Aphanomyces* und *Pythium* wurden mit ihren Traghyphen vom Verband des Mycelrasens abgelöst und so in einem hängenden Tropfen zum Ausschwärmen gebracht. Für diese Gattungen dienten Hanfsamen und Ameisenpuppen als Köder. Die Bildung von Zoosporen gelingt bei all diesen Pilzen leicht, wenn man sie in frisches Wasser überträgt.

II. Systematik der isolierten Pilze.

Es wurden isoliert aus den Ordnungen der:

Chytridiales:

Woroniaceae:

Pseudolpidium

Olpidium

Pleolpidium

Rhizophidium

Rhizophlyctis

Cladochytriaceae:

Cladochytrium

Nowakowskiella

Blastocladales:

Blastocladiaceae:

Allomyces

Saprolegniales:

Saprolegniaceae:

Thraustotheka

Dictyuchus

Brevilegnia

Saprolegnia

Achlya

Aphanomyces

Peronosporales:

Pythiaceae:

Pythium

Pythiomorpha

und außerdem noch *Mucoraceen* und höhere Pilze mit septierten Mycelien.

Bei der Gattung *Pseudolpidium* handelte es sich meist um *Pseudolpidium gracile* Butler und *P. Pythii* Butler, bei *Pleolpidium* meist um *inflatum* Butler, bei *Rhizophidium* um *Rh. pollinis* (Braun) Zopf, *Rh. carpophilum* (Zopf) Fischer und eine wohl neue Art. *Rhizophlyctis* war nur durch die Gattung *Rh. rosea* (de Bary und Woronin) Fischer vertreten, *Nowakowskiella* meist durch *N. elegans* (Nowak.) Schroeter, *Cladochytrium* durch *Cl. tenue* Nowakowski, *Allomyces* durch *arbusculus* E. I. Butler, *Thraustotheka* durch *Th. clavata* (de Bary) Humphr., *Saprolegnia* durch *S. Thureti* de Bary, *Aphanomyces* durch *A. scaber* de Bary, *Pythium* durch *P. de Baryanum* Hesse, *P. vexans* de Bary, *P. torulosum* Coker u. Patterson, *P. megalacanthum* de Bary.

III. Ergebnisse der Standortsuntersuchungen.

1. Die Anzahl der Gattungen in den Erden.

In fast sämtlichen Erdproben kamen *Phycomyceten* vor. Im allgemeinen fanden sich in ihnen mehrere Gattungen gleichzeitig, dazu Mu-

coraceen und Pilze mit septierten Mycelien, die auch sehr oft auftraten. Die Zahl der Pilzgattungen (außer *Mucoraceen* und höheren Pilzen) ist aus Abb. 1 ersichtlich: am häufigsten kamen 5 (in 34 von 144 Böden) selten bis zu 10 *Phycomyceten* vor.



Ab. 1. Häufigkeit der *Phycomycetengattungen* in den einzelnen Erden.

In nur 3 Erdproben waren gar keine *Phycomyceten* vorhanden; 2 davon stammten aus einem frisch vorgetriebenen Stollen, der 2 m weit horizontal in den Wall des Botanischen Gartens in Göttingen gegraben worden war, um Luftschutzzwecken zu dienen; das Erdreich darüber hatte eine Mächtigkeit von 4 m und war sehr kompakt. Diese beiden Proben konnten aller Voraussicht nach, wegen ihrer großen Entfernung von der Oberfläche kaum *Phycomyceten* enthalten. Erden mit 8 verschiedenen Gattungen waren schon sehr selten, 9 bzw. 10 Gattungen wurden aus nur je einer Erde isoliert. Die Erde mit 9 Gattungen stammte aus Herrenalb/Schwarzwald, von einem Graben am Wegrand, pH 6,5 (entnommen am 19. IX. 44, vgl. unten 3 c), und die mit 10 Gattungen aus Lauenau/Deister von einem Zugang zu einer Viehweide, pH 6,9 (entnommen am 19. X. 44).

2. Die allgemeine Häufigkeit.

Die einzelnen Gattungen wurden durchaus nicht gleich oft gefunden, sondern ihre Häufigkeit war sehr verschieden (Abb. 2).

Die Gattung *Pythium* war am reichsten vertreten. Sie kam fast in jeder Erde vor (in 129 von 144 = 89%) und wird, wenn man mit derartigen Untersuchungen beginnt, auch wohl immer zuerst entdeckt. *Rhizophlyctis*, die bereits von SÖRGEL als in Westindien weit verbreitet bezeichnet wurde, ist auch in deutschen Böden sehr häufig (116 mal = 80,5%). Auffallend ist, wie oft *Rhizophidium* isoliert werden konnte: 65% der Erden enthielten diesen Pilz. Mit einer Häufigkeit von 45% kann *Nowakowskiella* auch noch als recht verbreitet angesehen werden. Ebenso dürfte *Aphanomyces* mindestens als ziemlich verbreitet genannt werden, er trat immerhin in 20% der Erden auf. Dagegen war *Allomyces* in den von uns untersuchten Erden relativ selten; in den 144 Böden fand er sich nur 5 mal. Auch *Achlya* und *Pythiomorpha* wurden in nur 5 Erden festgestellt, und *Dictyuchus*, der seltenste von allen, fand sich nur 4 mal.

Die 16 verschiedenen isolierten Gattungen zeigten also einen recht großen Unterschied in ihrer Verbreitung. Neben Formen, die fast in jeder Erdprobe vorkommen, finden sich andere, die äußerst selten sind.

Bezieht man die *Mucoraceen* und höheren Pilze in diese Aufstellung mit ein, so schieben sich die *Mucoraceen*, die 139 mal isoliert wurden, noch vor *Pythium*, und die höheren Pilze stehen mit 118mal zwischen *Pythium* und *Rhizophlyctis*.

Vergleicht man diese Zahlen mit der allgemeinen Häufigkeit, die sich aus den 1615 gemachten Ansätzen ergibt, so erhält man eine annähernd parallele laufende Kurve (Abb. 2 gestrichelte Kurve). Von *Rhizophidium* können in

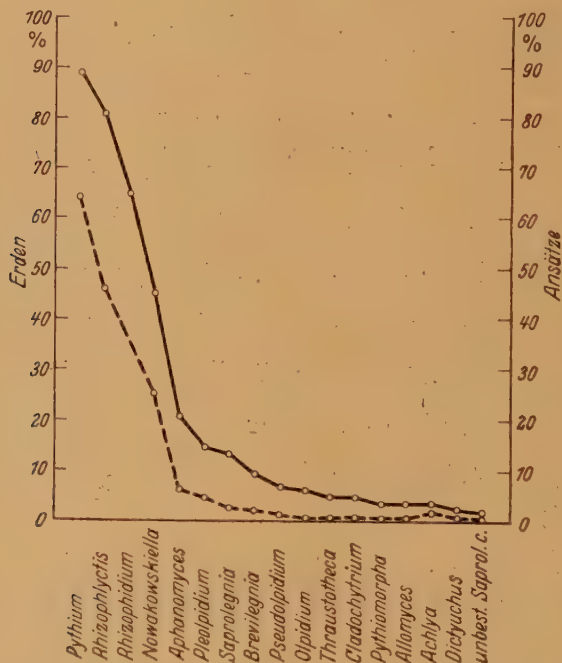


Abb. 2. Allgemeine Häufigkeit. (Ausgezogene Kurve: allgemeine Häufigkeit der Pilze in den 144 Erden, gestrichelte Kurve: allgemeine Häufigkeit der Pilze in den 1615 Ansätzen).

diesem Zusammenhang keine Zahlen angegeben werden, da in den ersten Ansätzen noch nicht Pinuspollen als Köder dienten, und nachträglich aus Mangel an Material nur ein Ansatz je Erde gemacht werden konnte.

3. Die verschiedenen Standorte.

a) Fluß-, Bach-, Teichufer.

Die Proben wurden meist von teils bewachsenen, teils unbewachsenen Ufern dicht über dem Wasserspiegel entnommen, oder sie stammten aus einem zeitweise austrocknenden Bachbett. Es war zu erwarten, daß

in diesen feuchten Formationen eine relativ reiche *Phycomyceten*-flora vorhanden sei. Tatsächlich war auch die Zahl der gefundenen Gattungen ziemlich hoch und ihr Auftreten in den verschiedenen Ansätzen häufig, wie die folgenden Beispiele zeigen:

Herrenalb/Schwarzwald, ausgetrocknetes Bachbett in einem Wiesental, sonnig, pH 5,4, (19. IX. 44); 12 mal angesetzt: *Rhizophidium pollinis* 12 mal, *Rhizophlyctis rosea* 4 mal, *Nowakowskiella* 8 mal, *Achlya* 8 mal und *Pythium* 7 mal gefunden. — **Lauenau/Deister**, schwach bewachsenes Ufer dicht an der Au, pH 6,8, (20. X. 44); 12 mal angesetzt: *Rhizophidium pollinis* 12 mal, *Nowakowskiella* 8 mal, *Saprolegnia* 1 mal, *Aphanomyces* 7 mal und *Pythium* 11 mal gefunden. — **Göttingen**, Botanischer Garten, Bachufer dicht am Wasser, unbewachsen, pH 6,1 (19. I. 45); 12 mal angesetzt: *Rhizophidium pollinis* 12 mal, *Rhizophlyctis* 2 mal, *Nowakowskiella* 9 mal, *Thraustotheca* 1 mal, *Brevilegnia* 3 mal, *Saprolegnia* 4 mal, *Aphanomyces* 5 mal und *Pythium* 12 mal gefunden.

Im ganzen wurden aus 21 Proben solcher Standorte, die 244 mal angesetzt wurden, 14 der insgesamt gefundenen 16 Gattungen isoliert (Abb. 3).

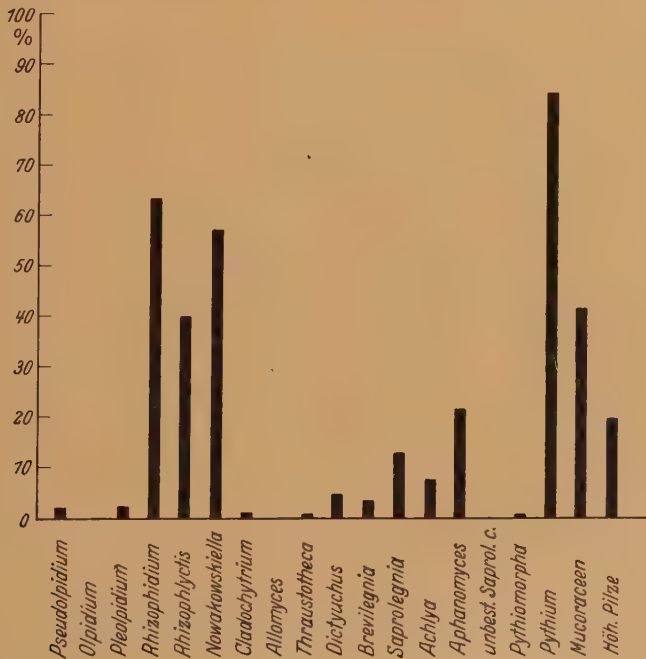


Abb. 3. Häufigkeit der Pilze an Fluß-, Bach- und Teichufern. Die Ordinate gibt die Prozentzahl der Erdproben an, in denen die Pilze auftraten.

Nur *Olpidium* und *Allomyces* fehlten. *Pythium* war am meisten vertreten. Recht häufig war auch *Rhizophidium*, während *Rhizophlyctis* hinter *Nowakowskiella* zurückblieb. Letzterer Pilz ist, wie die Gesamt-

heit der Untersuchungen ergab, zusammen mit den verschiedenen Gattungen der *Saprolegniaceen*, besonders an feuchte Standorte gebunden, während *Rhizophlyctis* sie nicht bevorzugt. *Mucoraceen* und höhere Pilze treten in diesen Gebieten nicht so häufig auf (vgl. auch Tab. 1).

Tabelle I. Häufigkeit der Gattungen in Prozent der Ansätze der Erdproben verschiedener Standorte.

	Ufer	Gräben	Wald	Wege	Äcker	Gärten	Weiden	Wiesen	unbeb. Land
<i>Pseudolpidium</i>	2	—	2	4	1	—	—	—	—
<i>Olpidium</i>	—	—	—	2	3	2	—	2	—
<i>Pleolpidium</i>	3	—	3	10	8	13	1	3	—
<i>Rhizophidium</i>	64	78	85	61	72	70	73	25	37
<i>Rhizophlyctis</i>	40	28	46	68	70	50	29	44	50
<i>Nowakowskiella</i>	58	52	4	11	21	22	72	10	—
<i>Cladochytrium</i>	1	3	—	—	—	4	—	1	—
<i>Allomyces</i>	—	—	—	1	1	—	2	—	—
<i>Thraustotheka</i>	1	—	—	—	2	—	4	1	—
<i>Dictyuchus</i>	5	—	—	—	—	—	3	—	—
<i>Brevilegnia</i>	4	4	—	5	—	—	6	—	1
<i>Saprolegnia</i>	14	3	2	—	—	2	8	3	—
<i>Achlya</i>	10	14	—	2	—	—	—	—	—
<i>Aphanomyces</i>	23	12	3	5	2	4	14	—	1
unbest. <i>Saprol.</i>	—	3	—	—	1	1	—	—	—
<i>Pythiomorpha</i>	1	—	—	1	1	—	3	—	—
<i>Pythium</i>	85	62	39	80	72	63	90	70	39
<i>Mucoraceen</i>	45	45	79	52	70	60	50	75	70
höhere Pilze	20	22	33	33	38	40	20	41	40

b) Kaum berührtes unkultiviertes Land.

Ein vollkommen anderes Bild bietet die Vegetation der niederen Pilze in unkultiviertem Land (Abb. 4). Allerdings gibt es in Deutsch-

land nur wenig Gebiete, die nicht ständig von Menschenhand angegangen und verändert werden, so daß es schwierig ist, Stellen zu finden, die vielleicht ein ungefähres Bild ziemlich ursprünglicher Pilzvegetation vermitteln könnten. Zur Erläuterung einige Standortangaben: **Osterode/Harz**, Nähe der Ruine, *Flieder*, *Ahorn*, pH 6; **Hohensalzburg**, Burghof, von hohen Mauern umgeben, pH 6,9; **Veitshöchheim/Würzburg**, Berg-hang, schwacher Grasbewuchs, einzelne Büsche, pH 6,5. Die Pilzausbeute war hier außerordentlich gering, nur 5 Gattungen wurden aus den 15 Erden bei 153 Ansätzen isoliert, davon *Aphanomyces* und *Brevilegnia* nur je einmal; sogar *Nowakowskiella*, die sonst an sämtlichen Standorten vorkam (vgl. Tabelle I), fehlte hier. Hauptsächlich waren *Mucoraceen* vorhanden, aber auch *Rhizophlyctis* war relativ häufig. Daher ist nicht nur die Zahl der Säulen in Abb. 4 klein sondern auch ihre Höhe ist gering.

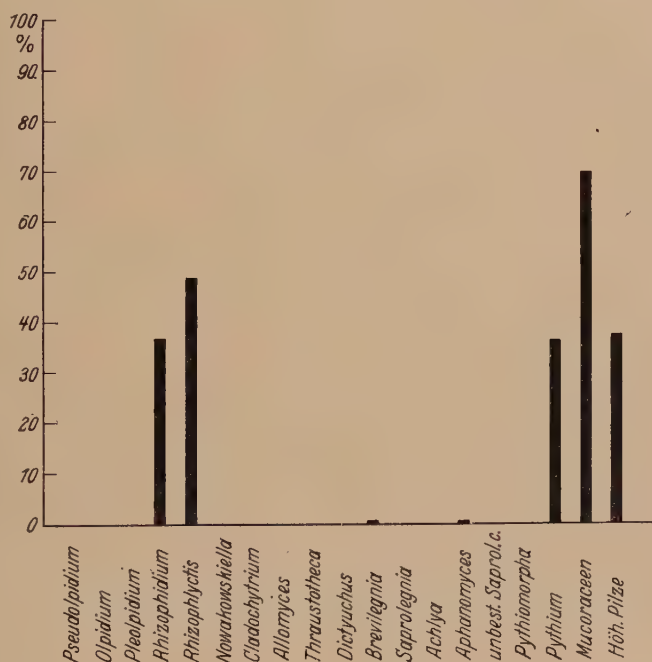


Abb. 4. Häufigkeit der Pilze an kaum berührten und unkultivierten Standorten.

c) Graben — Grabenrand.

Üppigere Entwicklung, die der an den Flußufern sehr ähnelt, boten die Grabenränder (Gräben neben Wegen zur Zeit der Erdprobenentnahme kein Wasser führend, aber kaum oder gar nicht mit höheren Pflanzen bewachsen; Ränder von Abflußgräben und ähnlichen Örtlichkeiten); es handelt sich also um feuchte Böden. 7 verschiedene Proben wurden

78 mal angesetzt. Die Häufigkeit der einzelnen Gattungen war abgesehen von *Rhizophidium pollinis*, der mit 78 % am stärksten vertreten war, ziemlich die gleiche wie an Ufern (Tab. I). Besonders phycomycetenreich war ein zur Zeit kein Wasser enthaltender Graben neben einem Fahrweg am Rand eines Waldes bei Herrenalb/Schwarzwald, in dem 9 verschiedene Gattungen gefunden wurden (vgl. III.1), und zwar in 12 Ansätzen *Rhizophidium pollinis* 12 mal, *Rhizophlyctis rosea* 12 mal, *Nowakowskiella* 11 mal, *Cladochytrium* 2 mal, *Thraustotheka* 1 mal, *Saprolegnia* 4 mal, *Achlya* 12 mal, *Aphanomyces* 3 mal und *Pythium* 2 mal. Der beste dieser Ansätze hatte 7 Gattungen nebeneinander, nämlich *Rhizophidium pollinis*, *Rhizophlyctis rosea*, *Nowakowskiella*, *Cladochytrium*, *Saprolegnia*, *Achlya* und *Pythium*. Wenn eine quantitative Erfassung mit unserer Methode auch nicht möglich ist, so gibt die Summe der oben angeführten Zahlen doch eine gewisse Vorstellung von der starken Anhäufung der *Phycomyceten* auf kleinstem Raum (jeder Ansatz enthielt etwa 1 ccm Erde).

d) Wald (Laub- und Nadelwald).

Im Vergleich zu der starken Verbreitung der höheren Pilze in den Wäldern muß man das Vorkommen der niederen *Phycomyceten* in diesen Gebieten als dürftig bezeichnen. Aus 17 Erdproben, die 184 mal angesetzt wurden, konnten nur 8 Gattungen isoliert werden, von ihnen traten die meisten, außer *Rhizophidium*, noch dazu höchst selten auf (Tab. I).

Bemerkenswert ist besonders, daß *Rhizophidium* in 85% der Ansätze gefunden wurde und damit am reichsten vertreten war. Er übertrifft selbst die sehr zahlreichen *Mucoraceen* und höheren Pilze. Die Spärlichkeit der *Phycomyceten* in den Wäldern wird besonders deutlich aus den Ansatzergebnissen der einzelnen Standorte:

Burghausen/Salzach (4. VIII. 44) Buchenwald, *pu* 5,9: 6 mal angesetzt: *Rhizophlyctis rosea* 1 mal gefunden. — **Herrenalb/Schwarzwald** (11. IX. 44) Fichtenwald, *pu* 4,9: 12 mal angesetzt: *Rhizophidium pollinis* 12 mal gefunden. — **Göttingen** (20. XI. 45) Mischwald, *pu* 6: 12 mal angesetzt: *Pythium* 1 mal, *Rhizophidium* 11 mal gefunden. — **Göttingen** (23. XI. 45) Laubwald, *pu* 5,8: 12 mal angesetzt: *Rhizophidium pollinis* 12 mal, *Nowakowskiella* 4 mal und *Pythium* 2 mal gefunden. — **Harz** in der Nähe des Brockens (30. VI. 44) Fichtenwald, *pu* 5,6: 10 mal angesetzt: *Rhizophidium pollinis* 10 mal gefunden. — **Harz** etwas unterhalb des Brockens (19. VII. 44) Fichtenwald, *pu* 4,7: 10 mal angesetzt: *Rhizophidium pollinis* 9 mal gefunden.

e) Wege — Straßen.

Hier handelt es sich meist um sonnige, zeitweise stark austrocknende Standorte (Feldwege, Gartenwege, Waldwege, ausgetretene Fußwege, Straßenerde zwischen den Pflastersteinen), die aber trotzdem ein beachtliches Pilzvorkommen aufwiesen.

Aus 20 Erdproben, die 240 mal angesetzt wurden, konnten 12 Gattungen isoliert werden. Wieder standen *Pythium*, *Rhizophlyctis* und *Rhizophidium* an der Spitze, während *Nowakowskiella* stark zurückblieb. Besonders reich besiedelt waren im allgemeinen Stellen mit aus-

gesprochenen Lehmböden. Zur besseren Vorstellung seien auch hier einige Beispiele angeführt:

Lauenau/Deister, Fahrweg vor einem Haus, pH 7,3 (19. X. 44); 12 mal angesetzt: *Rhizopidium pollinis* 12 mal, *Rhizophlyctis rosea* 8 mal, *Olpidium* 1 mal, *Aphanomyces* 4 mal und *Pythium* 12 mal gefunden. — **Duderstadt**, Feldweg von Sonne ausgetrocknet, lehmig, pH 6,9 (1. VIII. 45); 12 mal angesetzt: *Pythium* 11 mal, *Rhizophlyctis rosea* 12 mal, *Rhizopidium pollinis* 10 mal, *Pleopidium* 2 mal, *Olpidium* 1 mal, *Allomyces* 1 mal gefunden. — **Göttingen**, Weg, stark ausgetreten zwischen Schrebergärten, Lehmboden, pH 6,8 (3. V. 45); 12 mal angesetzt: *Pythium* 11 mal, *Rhizophlyctis rosea* 11 mal, *Rhizopidium pollinis* 12 mal, *Brevilegnia* 10 mal und *Pythiomorpha* 1 mal gefunden.

Diese Erdproben wurden alle drei zu einem Zeitpunkt entnommen, nachdem längere Zeit trockenes und heiteres Wetter geherrscht hatte, so daß sie ziemlich erheblich ausgetrocknet waren. Selbst Erde von einem staubtrockenen Weg enthielt *Pythium*, *Rhizophlyctis rosea* und *Rhizopidium pollinis*.

f) Acker.

17 verschiedene Proben wurden mit 211 Ansätzen untersucht. Die oft gedüngten und bearbeiteten Böden wiesen eine *Phycomyceten*flora auf, die auch eine Anzahl seltener Formen umfaßt; so wurde *Aphanomyces* in Rübenfeldern gefunden. Auch die sonst nicht häufigen *Pseudolpidium*, *Olpidium*, *Pleopidium*, *Allomyces*, *Thraustotheca* und *Pythiomorpha* wurden nachgewiesen. Die häufig auftretenden Formen waren in rund 70% der Erden vorhanden, die Besiedlung war also ziemlich reichlich.

g) Gärten.

Aus den 13 Proben war die Ausbeute etwas geringer als aus den Ackerböden, und zwar sowohl hinsichtlich der Zahl der Gattungen (*Allomyces*, *Thraustotheca* und *Pythiomorpha* fehlten, dafür war das sonst recht seltene *Cladochytrium* vorhanden) als auch deren Häufigkeit.

h) Viehweiden, Viehtränken.

Bei diesen Böden handelt es sich meist um sonnige Standorte, doch waren die Weiden oft an Flußläufen oder Bächen gelegen, so daß die Erden nie so starker Austrocknung ausgesetzt waren, wie etwa die unter „Wege — Straßen“ behandelten. Es sind vielmehr durchweg gut feuchte Gebiete, die deshalb auch eine reichere Verbreitung der Pilze erwarten ließen, was sich dann auch bestätigte. Wie bei den Gräben und Flußufern trat relativ sehr häufig *Nowakowskiella* auf, während *Rhizophlyctis rosea* dahinter zurückblieb. Unter den 12 isolierten Gattungen befanden sich auch sonst seltene Gäste, wie *Allomyces*, *Thraustotheca*, *Dictyuchus*, *Brevilegnia*, *Saprolegnia* und *Pythiomorpha* und außerdem *Aphanomyces*, *Rhizopidium* und *Pythium*.

i) Wiesen — Rasen.

Hier sind Bodenproben zusammengefaßt, die einerseits von Wiesen stammten, die Flußläufe umsäumen, und andererseits von Rasenflächen, z. B. Parkanlagen. Weidendes Vieh war also nicht vorhanden. Das dürfte also der Grund sein, weshalb die Pilzflora qualitativ wie quantitativ spärlicher war als bei den Weiden. Gefunden wurden *Olpidium*, *Pleolpidium*, *Rhizophidium*, *Rhizophlyctis*, *Nowakowskiella*, *Cladochytrium*, *Thraustotheca*, *Saprolegnia* und *Pythium*. Aber nur *Pythium*, *Rhizophidium* und *Rhizophlyctis* waren häufig vertreten, die meisten anderen Gattungen wurden nur einmal isoliert.

4. Der Pilzreichtum der einzelnen Standorte.

Die Häufigkeit der Pilze an den einzelnen Standorten ist aus Tabelle I ohne weiteres abzulesen. Sie läßt sich aber auch noch in anderer Weise zahlenmäßig ausdrücken. Dividiert man die Zahl der gefundenen Pilze durch die Zahl der Ansätze, so erhält man ein anschauliches Bild von dem Pilzgehalt der einzelnen Standorte. Diese Berechnung ist nachstehend einerseits für die Gesamtheit aller Pilze, also einschließlich der *Mucoraceen* und *höheren Pilze*, durchgeführt, und außerdem allein für diejenigen *Phycomyceten*, die als selten bezeichnet werden müssen, also ohne *Pythium*, *Rhizophlyctis rosea*, *Mucoraceen* und die *höheren Pilze*. In den 244 Ansätzen von Fluß-, Bach- und Teichufern wurden beispielsweise in jedem Ansatz mehrere Pilze gefunden, und zwar bei Zusammenzählen der sämtlichen Funde insgesamt 730 und bei Zusammenzählen nur der seltenen Pilze 278. Die Pilzhäufigkeit pro Ansatz betrug also 2,98 bzw. 1,13.

In Tabelle II sind die Standorte nach der Höhe ihres Gesamtpilzgehaltes geordnet. Die Fluß-, Bach- und Teichufer hatten mit 2,98 die

Tabelle II. Pilzhäufigkeit (sämtliche)

Standort	Zahl der Ansätze	Pilzhäufigkeit
Fluß-, Bach-, Teichufer	244	2,98
Viehweide, -tränke	148	2,92
Acker	211	2,81
Weg — Straße	240	2,72
Graben, Grabenrand	78	2,60
Garten	151	2,57
Wiese — Rasen	82	2,37
Wald (Laub- und Nadelwald)	184	2,05
Kaum berührtes unkultiv. Land	153	1,96

größte Pilzhäufigkeit. In ganz geringem Abstand folgen Viehweiden und Viehtränken mit 2,92. Die Pilzhäufigkeit nimmt dann in den verschiedenen anderen Gebieten nach und nach ab, bis sie ihren tiefsten Stand in kaum berührten und unkultivierten Standorten mit 1,96 erreicht

Bei der Aufstellung der Häufigkeit der seltenen Pilze (Tab. III) verändert sich die Reihenfolge der Standorte etwas, und vor allem treten stärkere Unterschiede hervor.

Während Fluß-, Bach-, Teichufer und Viehweide und -tränke mit gleicher Häufigkeit auch hier an erster Stelle stehen, erweisen sich nun die Gräben als nur wenig ärmer an *Phycomyceten*; Gärten, Wege und Äcker folgen erst in erheblichem Abstand (nur etwa die Hälfte der Häufigkeit wie in Gräben); die Wiesen zeigen eine weitere Reduktion des Pilzgehaltes um rund 50% und gleiches gilt nochmals für die Wälder; das unkultivierte Land fällt dann mit weniger als 1% des Pilzgehaltes

Tabelle III. *Pilzhäufigkeit (seltene)*

Standort	Zahl der Ansätze	Pilzhäufigkeit
Fluß-, Bach-, Teichufer	244	1,13
Viehweide, -tränke	148	1,13
Graben, Grabenrand	78	0,91
Garten	151	0,48
Weg — Straße	240	0,42
Acker	211	0,38
Wiese — Rasen	82	0,18
Wald (Laub- und Nadelwald)	184	0,09
Kaum berührtes unkultiv. Land	153	0,01

der Ufer ganz ab. Hieraus ist wiederum ersichtlich, daß die niederen *Phycomyceten* hauptsächlich feuchte Gebiete besiedeln, wie es ja auch ihrer ganzen Entwicklungsweise entspricht. Diese Feststellung schließt aber nicht aus, was nochmals betont sei, daß die verschiedenen Formen trotzdem ziemlich häufig in Gebieten sein können, wo man sie danach weniger erwarten sollte. Die Zahl 0,42 für die oft stark trockenen Wege und Straßen ist ein durchaus beachtbarer Wert. Sehr wahrscheinlich steht ihr relativ häufiges Vorkommen hier in Zusammenhang mit den wohl allgemein dort vorhandenen organischen Verunreinigungen. Daß diese eine Rolle für die Häufigkeit unserer Pilze spielen dürften, darf man wohl auch aus der relativ starken Besiedlung der Viehweiden folgern.

5. Die geographische Verteilung der *Phycomyceten*.

In Tabelle IV ist das Vorkommen der einzelnen Gattungen nach geographischen Gesichtspunkten zusammengestellt. Man sieht daraus, daß im großen und ganzen niedere *Phycomyceten* überall verbreitet sind. Bei näherem Studieren der Tabelle möchte man aber doch wohl aus ihr herauslesen, daß es einzelne Gebiete gibt, die ein besonders reiches Pilzvorkommen zeigen. Ein direkter Vergleich der Anzahl der Funde der Gattungen an den einzelnen Örtlichkeiten ist allerdings nicht möglich, weil an manchen Stellen sehr viel mehr Erdproben entnommen worden sind als an anderen (z. B. Göttingen 46, Lüneburg 6). Die prozentuale

Tabelle IV. *Verbreitung der einzelnen Gattungen in den verschiedenen Gebieten Deutschlands (die Zahlen geben die Zahlen der Erden an, in denen die Pilze gefunden wurden).*

	Lauenau/Deister	Göttingen	Würzburg	Herrenalb./Schwarzw.	Insel Wollin	Lüneburg	Harz	Bad Elster	Salzburg
Zahl der Erdproben	26	46	15	13	11	6	11	9	7
Zahl der Ansätze	347	552	180	143	131	62	114	72	36
<i>Pseudolpidium</i>	2	3	5	—	—	—	—	—	—
<i>Olpidium</i>	2	6	1	—	—	1	—	—	—
<i>Pleolpidium</i>	3	9	3	3	3	—	—	—	—
<i>Rhizophidium</i>	25	37	13	10	4	1	4	—	—
<i>Rhizophlyctis</i>	21	40	15	10	10	4	6	6	4
<i>Nowakowskiella</i>	22	20	3	6	5	4	3	2	—
<i>Cladochytrium</i>	1	1	1	1	—	1	1	1	—
<i>Allomyces</i>	3	1	—	—	1	—	—	—	—
<i>Thraustotheca</i>	2	2	—	1	—	—	—	1	1
<i>Dictyuchus</i>	3	—	1	—	—	—	—	—	—
<i>Brevilegnia</i>	6	3	2	1	—	1	—	—	—
<i>Saprolegnia</i>	9	5	—	2	—	1	1	2	—
<i>Achlya</i>	2	1	—	2	—	—	—	—	—
<i>Aphanomyces</i>	12	9	2	4	1	1	—	—	1
unbest. <i>Saprolegniaceae</i>	—	1	—	—	1	1	—	—	—
<i>Pythiomorpha</i>	2	2	—	—	1	—	—	—	—
<i>Pythium</i>	26	44	14	10	11	5	8	6	5
<i>Mucoraceen</i>	26	44	15	12	11	6	11	8	6
höh. Pilze	18	35	14	13	10	5	11	6	6
Summe der aufgeführten Pilze ohne <i>Mucoraceen</i> und höheren Pilze	141	184	60	50	37	20	23	18	11
Prozentualer Pilzgehalt (ohne <i>Mucor</i> , u. höh. Pilze)	542%	400%	400%	384%	336%	333%	209%	200%	158%

Berechnung (letzte Rubrik) unter Ausschaltung der *Mucoraceen* und höheren Pilze ergibt aber auch Unterschiede. Welche Faktoren dafür alle maßgeblich sind bzw. sein könnten, läßt sich nicht sagen. In erster

Linie ist wohl an Bodenazidität und Bodenfeuchtigkeit zu denken (siehe unten).

6. Einfluß edaphischer Faktoren auf den Pilzgehalt.

a) Bodenfeuchtigkeit.

Ganz allgemein kamen die niederen seltenen *Phycomyceten* an feuchten Standorten reichlicher vor als an trockenen; das ist so selbstverständlich, daß es dafür keiner Einzelbelege bedarf. Berechnet man, wie in Tabelle II und III, die Häufigkeit des Pilzvorkommens, so ergibt sich für die Gesamtheit der Pilze für feuchte Standorte (252 Ansätze) der Wert 3,01, für trockene (226 Ansätze) 2,27 und für die selteneren *Phycomyceten* 1,30 und 0,04! Die seltenen Formen waren also an feuchten Standorten 30 mal so häufig als an trockenen. Eine Ausnahme von der Regel machte nur *Rhizophlyctis*. Dieser Pilz besiedelte nur 30% der feuchteren Böden, dagegen über 60% der trockeneren Standorte. Er ist also an das Landleben wesentlich besser angepaßt als die übrigen niedrigen *Phycomyceten* und verhält sich in dieser Hinsicht wie die *Mucorineen* und höheren Pilze; von ihnen waren die feuchten Böden zu 42 bzw. 15% besiedelt, die weniger nassen dagegen zu 62 bzw. 38%.

b) Die Bodenazidität.

Von den einzelnen Erden wurden *pH*-Messungen mit der Chinhydronmethode nach LAUTENSCHLÄGER gemacht. Nach der Aufstellung in Abb. 5, wo die Funde im *pH*-Bereich 7,0 bis 8,1 durch ausgefüllte, im *pH*-Gebiet 4,7 bis 6,1 durch umrandete Säulen eingetragen sind, scheinen einige Gattungen mehr alkalische, andere dagegen mehr saure Böden vorzuziehen. Das schließt nicht aus, daß die einzelnen Gattungen in einem ziemlich weiten *pH*-Bereich gefunden wurden. So kommen z. B. vor

<i>Pleolpidium</i>	bei <i>pH</i> 5,5—7,6	<i>Brevilegnia</i>	bei <i>pH</i> 5,6—7,1
<i>Rhizophidium</i>	„ „ 4,9—7,3	<i>Saprolegnia</i>	„ „ 4,9—7,1
<i>Rhizophlyctis</i>	„ „ 4,6—7,8	<i>Aphanomyces</i>	„ „ 4,8—7,8
<i>Nowakowskiella</i>	„ „ 5,1—7,8	<i>Pythium</i>	„ „ 4,4—7,8
<i>Cladochytrium</i>	„ „ 5,4—6,8		

Eine klare Beziehung zur Bodenazidität läßt sich daher vorläufig noch nicht aufstellen.

c) Lehm-Sandboden.

Während der Durchführung der Untersuchungen fiel auf, daß sandige Böden (z. B. die von Lüneburg und der Insel Wollin) weniger Pilze enthielten als die lehmigen (Göttingen, Lauenau). Dafür einige Beispiele: **Lauenau**, Weg zwischen 2 Äckern, sonnig, Lehm Boden, *pH* 7 (7. X. 45); 12 mal angesetzt: *Pythium* 12 mal, *Nowakowskiella* 11 mal, *Rhizophlyctis rosea* 11 mal, *Rhizophidium pollinis* 11 mal, *Achlya* 3 mal, *Pseudolpidium* 1 mal und *Allomyces* 1 mal gefunden. — **Lauenau**, Zugang zu einer Viehweide, *pH* 6,9, (19. X. 44); 12 mal angesetzt: *Pythium* 10 mal, *Rhizophlyctis* 9 mal, *Nowakowskiella* 11 mal, *Rhizophidium* 8 mal, *Saprolegnia* 6 mal, *Dictyuchus* 5 mal, *Aphanomyces* 2 mal, *Allomyces* 1 mal, *Brevilegnia* 1 mal, *Pythiomorpha* 1 mal gefunden. — **Lauenau**, Ufer an der Au, etwa 1½ m über dem Wasserspiegel,

Erde von der Uferbefestigung, Lehm Boden, pH 6,8 (20. X. 44): 12 mal angesetzt: *Pythium* 11 mal, *Nowakowskiella* 8 mal, *Rhizophidium* 12 mal, *Aphanomyces* 7 mal und *Saprolegnia* 1 mal gefunden. — **Wollin**, Luzernfeld, sonnig, Sandboden, pH 7,1 (29. IX. 44): 12 mal angesetzt: *Pythium* 10 mal, *Rhizophlyctis* 6 mal gefunden. — **Wollin**, Seeufer feucht, Sandboden, pH 7,8 (3. X. 44): 12 mal angesetzt: *Pythium* 11 mal, *Rhizophlyctis* 9 mal, *Nowakowskiella* 2 mal und *Aphanomyces* 1 mal gefunden. — **Wollin**, Wiese, feucht, Sandboden, pH 7,6 (3. X. 44): 12 mal angesetzt: *Pythium* 10 mal, *Pleolpidium* 2 mal, *Nowakowskiella* 1 mal gefunden.

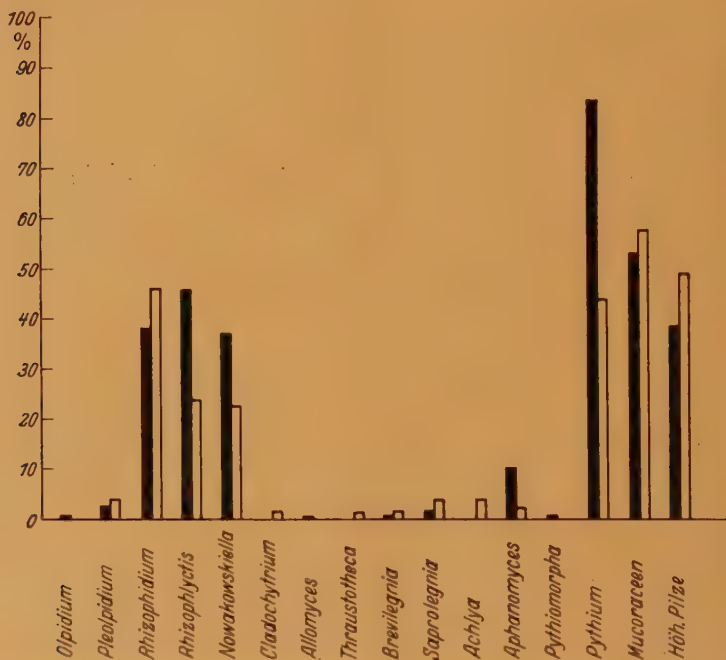


Abb. 5. Häufigkeit der Pilze in alkalischen und sauren Böden (schw. Säulen alkal. Böden v. pH 7,0—8,1, umrandete Säulen saure Böden v. pH 4,7—6,1).

Die Pilzfunde in den Wolliner Sandböden waren also deutlich geringer. Daß das eine allgemeine Regel ist, wird noch deutlicher, wenn man die Pilzfunde von einer größeren Anzahl von Lehm Böden verschiedener Gebiete denen von einer Anzahl von Sandböden gegenüberstellt, wie es in Abbildung 6 geschehen ist. Es wurden 17 Erdproben aus Lehm Böden und 19 Erdproben von Sandböden dazu verwandt. Die Anzahl der Funde auf Lehm Böden ist durch eine schwarze, die auf Sand durch eine umrandete Säule wiedergegeben. Mit Ausnahme von *Rhizophlyctis* sind die massiven Säulen höher als die umrandeten. *Rhizophlyctis* nimmt also auch in dieser Hinsicht eine Ausnahmestellung ein. Die errechnete Häufigkeit ist bei 216 Ansätzen auf Lehm Böden für alle Pilze zusammen 2,77, für nur die seltenen 0,77 und auf Sandböden 2,37.

bzw. 0,14. Lehm Böden sind also von den seltenen *Phycomyceten* 5 bis 6 mal so stark besiedelt als Sandböden.

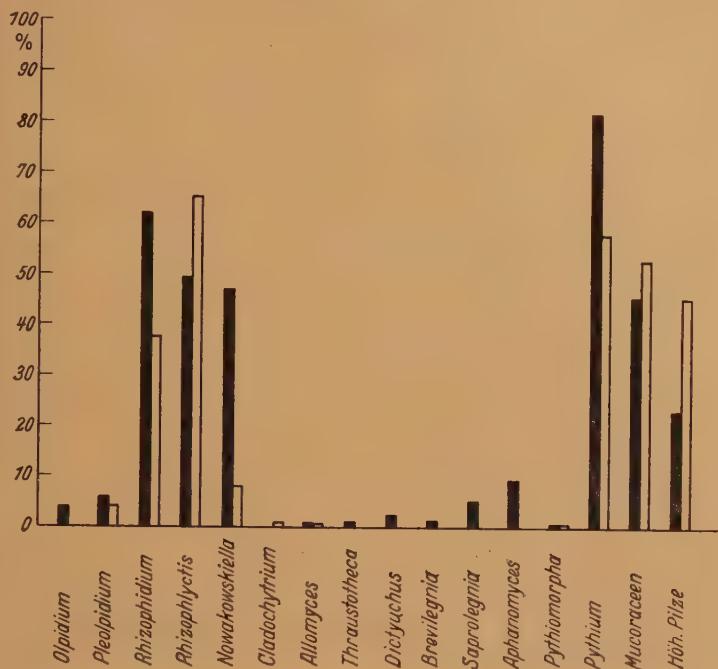


Abb. 6. Pilzhäufigkeit in Lehm- und Sandböden (schwarze Säulen Lehmböden, umrandete Säulen Sandböden).

IV. Standortliste der in unseren Untersuchungen seltener aufgetretenen Formen.

Pleolpidium: Herrenalb/Schwarzwald: Gartenweg, feiner Kies (18. IX. 44); Kartoffelacker (19. IX. 44). Wollin/Ostsee: Plantage unter Bäumen, Sandboden, schattig (21. IX. 44); Kartoffelacker (29. IX. 44); moorige Wiese 3. X. 44). Göttingen, Gartenerde aus dem Botanischen Garten (31. I. 45); Getreidefeldbrache (2. III. 45); Rapsfeld (3. V. 45); Acker mit jungem Getreide (8. V. 45); Weg zwischen 2 Äckern (9. V. 45); Werxhausen, Feldweg (5. VI. 45); Olenhusen, Kartoffelacker (12. VIII. 45); Schnedinghausen, Spargelbeet (22. VIII. 45); Duderstadt, Feldweg (1. VIII. 45). Würzburg, am Main bei Veitshöchheim, oberhalb der Befestigungssteine (29. IX. 45); Weg bei der Steinburg, trocken, sandig (31. IX. 45); unter einem Birnbaum neben Weingärten, schattig (31. IX. 45). Lauenau/Deister: Gartenweg (4. X. 45); Gartenweg schattig (4. X. 45); Ufer an der Au, Erde von der Uferbefestigung nicht direkt am Wasser (4. X. 45).

Pseudolpidium: Würzburg, dicht am Main bei Veitshöchheim, oberhalb der Befestigungssteine (29. VIII. 45); Zufluß zum Main bei Veitshöchheim, feucht, bewachsen (31. VIII. 45); Weg zwischen den Weingärten (1. IX. 45); Fußweg oberhalb des „Käppele“ (3. IX. 45); Wegrand unter Bäumen (3. IX. 45).

Lauenau/Deister: Kartoffelacker (4. X. 45); Feldweg (7. X. 45). **Göttingen:** Wiesenweg (5. XI. 45); Laubwald (Buche) (20. XI. 45); Nadelwald (6. II. 45). *Olpidium:* **Lauenau/Deister:** Fußweg (19. X. 44). **Lüneburg:** umgegrabene Rasenfläche (27. I. 45). **Göttingen:** Botanischer Garten, Gartenerde (31. I. 45); frisch geeggtter Acker (8. V. 45); Werxhausen, Feldweg (5. VI. 45); Schnedinghausen, Spargelbeet (22. VII. 45); Duderstadt, Kartoffelacker (31. VII. 45). Duderstadt, Feldweg (1. VIII. 45). **Würzburg:** Veitshöchheim, Fußweg (28. VIII. 45).

Rhizophidium sp.: **Wollin/Ostsee:** bewachsener Hang (12. IX. 44); ruhendes Land, stark mit Gras bewachsen (29. IX. 44). **Göttingen:** Kartoffelacker (26. III. 45); gemähtes Getreidefeld, trocken (2. VIII. 45); Nadelwald (6. II. 45); Werxhausen, Weg hinter einem Wald, sonnig (5. VI. 45); Rosdorf, frisch geeggttes Feld, ziemlich trocken (12. VII. 45); Schnedinghausen, Gartenerde (22. VII. 45); Werleshausen, Acker (26. VII. 44); Duderstadt, Erde von einem Kartoffelacker, lehmig (17. VIII. 45); Duderstadt, Stoppelfeld (Hafer) (31. VII. 45); Duderstadt, Weg von Sonne stark ausgetrocknet, lehmig (31. VIII. 45). **Würzburg:** Veitshöchheim, Weinberg, Südhang (28. VIII. 45); Veitshöchheim, Weg zum Main, feucht (31. VIII. 45); Veitshöchheim, Zufluß zum Main, Ufer, feucht (31. VIII. 45); Weinberg (31. VIII. 45); Weg auf dem Steinberg, sandig (1. IX. 45); Weinberg, Südhang (1. IX. 45); Weg, unter Bäumen (3. IX. 45). **Lauenau/Deister:** Runkelfeld (5. X. 45).

Cladochytrium: **Lüneburg:** Garten (2. V. 44). **Göttingen:** Botanischer Garten, Weg (4. V. 44). **Bad Elster:** Wiese an der Elster (17. VII. 44). **Osterode/Harz:** Gartenerde (8. VIII. 44). **Herrenalb/Schwarzwald:** Grabenrand, feucht (19. IX. 44). **Lauenau/Deister:** Gartenerde (20. X. 44). **Würzburg:** Veitshöchheim, Mainufer, bewachsen (29. VIII. 45).

Allomyces: **Wollin/Ostsee:** Kartoffelacker (29. IX. 44). **Lauenau/Deister:** Zugang zu einer Viehweide (19. X. 44); Weg, Lehm (5. X. 45); Feldweg (7. X. 45). **Göttingen:** Duderstadt, Weg von Sonne ausgetrocknet, lehmig (1. VIII. 45).

Thraustotheka: **Bad Elster:** Wiese an der Elster (17. VII. 44). **Burghausen:** Ufer an der Salzach, nahe dem Wasser (3. VIII. 44). **Herrenalb/Schwarzwald:** Grabenrand (19. IX. 44); Kartoffelacker (19. IX. 45). **Göttingen:** Bachufer (19. I. 45); Duderstadt, Kartoffelacker, Lehm (31. VII. 45). **Lauenau/Deister:** Zugang zu einer Viehweide (5. X. 45); Ufer eines Abflußgrabens (15. X. 45).

Dictyuchus: **Lauenau/Deister:** Zugang zu einer Viehweide (19. X. 44); Ufer an der Au (4. X. 45); Ufer an der Au, von der vorherigen Stelle ein Stück entfernt (5. X. 45). **Würzburg:** Veitshöchheim, Zufluß zum Main, Ufer (30. VIII. 45).

Brevilegnia: **Lüneburg:** Grabenufer, feucht (3. V. 44). **Göttingen:** Weg im Botanischen Garten (4. V. 44); Botanischer Garten, Bachufer (19. I. 45); Weg (3. V. 45); unbebautes Land (9. V. 45). **Herrenalb/Schwarzwald:** Bachüberlauf über einen Weg (19. IX. 44). **Lauenau/Deister:** Zugang zu einer Viehweide (19. X. 44); Maulwurfshäufen auf einer Viehweide (19. X. 44); Hof mit Gras bewachsen (5. X. 45); Zugang zu einer Viehweide (5. X. 45); Viehtränke an der Au (7. X. 45); Viehweide (15. I. 45). **Würzburg:** Veitshöchheim, Weg zum Main, feucht (31. VIII. 45); Veitshöchheim, Zufluß zum Main, Ufer feucht (31. VIII. 45).

Saprolegnia: **Lüneburg:** Garten, feucht (3. V. 44). **Harz:** mooriger Boden (23. VI. 44). **Göttingen:** Adelebsen, Weg von Bach überflossen (23. V. 44); Bachufer (19. I. 45); ausgetrocknetes Bachbett (2. VIII. 45); Kiesteich, flaches

Ufer (5. XI. 45); Hainberg unter Taxus (20. XI. 45). **Herrenalb/Schwarzwald**: Grabenrand (19. IX. 44); Bachüberlauf über einen Weg (19. IX. 44). **Bad Elster**: „Moortasche“ (6. X. 44); Ufer der Elster, Wiese (6. X. 44). **Lauenau/Deister**: Zugang zu einer Viehweide (19. X. 44); Viehweide, feucht (19. X. 44); Maulwurfshaufen auf einer Viehweide (19. X. 44); Ufer dicht an der Au (20. X. 44); Uferbefestigung (4. X. 45); Flußufer (5. X. 45); Weg zu einer Viehweide (5. X. 45); Viehtränke (15. X. 45); Grabenrand (15. X. 45).

Achlya: **Herrenalb/Schwarzwald**: Grabenrand (19. IX. 44); ausgetrocknetes Bachbett (19. IX. 44). **Göttingen**: Duderstadt, Bachufer (31. VII. 45). **Lauenau/Deister**: Flußufer (5. X. 45); Feldweg (7. X. 45).

Aphanomyces: **Lüneburg**: Grabenrand (2. V. 44). **Göttingen**: Adelebsen, Weg von Bach überflossen (23. V. 44); Botanischer Garten (24. V. 44); Bachufer (19. I. 45); frisch geeegter Acker (5. V. 45); Acker (9. V. 45); Rosdorf, Bachufer (12. VII. 45); Duderstadt, Bachufer (31. VII. 45); ausgetrocknetes Bachbett (2. VIII. 45); Hainberg, unter Taxus (20. XI. 45). **Burghausen**: Nordhang an der Salzach, unter Holunder und Buchen (1. VIII. 44). **Herrenalb/Schwarzwald**: unter Buche, schattig, feucht (15. IX. 44); Gartenweg (18. IX. 44); Grabenrand 19. IX. 44); Bachüberlauf über einen Weg (19. IX. 44). **Wollin/Ostsee**: Seeufer (3. X. 44). **Lauenau/Deister**: Zugang zu einer Viehweide (19. X. 44); Weg (19. X. 44); Maulwurfshaufen auf einer Viehweide (19. X. 44); Weg zu einem Pferdestall (20. X. 44); Ufer dicht an der Au (20. X. 44); Flußufer (4. X. 45); Weide (3. X. 45); Flußufer, dicht am Wasser (5. X. 45); Weg zu einer Viehweide (5. X. 45); Runkelfeld (5. X. 45); Getreidefeld (7. X. 45); Viehtränke (7. X. 45). **Würzburg**: Weg auf dem Steinberg, schattig (31. VIII. 45); Weg oberhalb des „Käppele“ (3. IX. 45).

Pythiomorpha: **Göttingen**: Witzenhausen, Viehtränke a. d. Werra (8. VIII. 44); Weg (3. V. 45). **Wollin/Ostsee**: Runkelfeld (3. X. 44). **Lauenau/Deister**: Zugang zu einer Viehweide (19. X. 44); Viehtränke (7. X. 45).

V. Physiologische Untersuchungen.

Um zu ermitteln, wie weit die Pilze widerstandsfähig gegen klimatische Faktoren wie Trockenheit, Wärme und Kälte sind, wurden im Laboratorium Trocken-, Hitze- und Kälteresistenzversuche angestellt. Und zwar mit folgenden Arten:

Chytridiales: *Rhizophidium pollinis* (Braun) Zopf, *Rhizophidium* sp., *Rhizophlyctis rosea* (de Bary und Woronin) Fischer, *Nowakowskiella elegans* (Nowak) Schroeter. **Blastocladales**: *Allomyces javanicus* Kniep. **Saprolegniales**: *Thraustotheca clavata* (de Bary) Humphr., *Dictyuchus*, *Saprolegnia Thureti* de Bary, *Aphanomyces scaber* de Bary. **Peronosporales**: *Pythium de Baryanum* Hesse.

a). Trockenresistenz.

Die von SÖRGE L verarbeiteten Erdproben, die oft 2 Jahre alt und stark ausgetrocknet waren, hatten noch ein starkes Pilzvorkommen gezeigt, so daß schon daraus zu schließen ist, daß die niederen *Phycomyceten* gegen Austrocknung ziemlich unempfindlich sind.

Zur Prüfung der Austrocknungsfähigkeit wurden aus den Reinkulturen der 10 Pilze Köder mit dem anhaftenden Pilz entnommen, und diese mit etwa 10 ccm mäßig feuchter Erde innig durchmischt. Dazu wurde in allen Fällen einerseits sterilisierte und andererseits unsterilisierte Erde benutzt.

Die Erde wurde in sterile Petrischalen gefüllt, und diese offen im Raum 14 Tage bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Um das Hineinfallen von Staubteilchen und evtl. Keimen zu verhindern, waren sie mit einem Deckel aus sterilem Filtrierpapier locker bedeckt. Die Erden trockneten auf diese Weise stark aus; im Mittel verloren sie 94,1% ihres ursprünglichen Wassergehaltes. Nun wurden Proben von ihnen in Petrischalen mit Wasser gebracht und in der üblichen Weise mit Ködern angesetzt. Traten an diesen nach 14 Tagen in den angesetzten Schalen keine Pilze auf, so war der Pilz nicht mehr am Leben.

Das war bei *Nowakowskiella*, *Thraustotheca*, *Dictyuchus*, *Saprolegnia* und *Aphanomyces* der Fall; aus den Erden mit *Rhizophidium pollinis*, *Rhizophidium sp.*, *Rhizophlyctis rosea*, *Allomyces* und *Pythium* bildeten sich auf den ausgestreuten Ködern aber Mycelien bzw. Sporangien, sie hatten die Austrocknung also überstanden. Nach der 14tägigen Austrocknung im Zimmer kamen die Erden dann noch 4 Tage in einen Exsikkator über Blaugel. Ihr Wassergehalt ging dadurch im Mittel auf 3,1% der Ausgangsfeuchtigkeit zurück. Auch diese weitere Austrocknung wurde von den Pilzen überlebt. In den nicht der Austrocknung ausgesetzten Kontrollen waren alle Pilze noch am Leben. *Rhizophidium pollinis*, *Rhizophidium sp.*, *Rhizophlyctis*, *Allomyces* und *Pythium* sind demnach gegen Austrocknung recht widerstandsfähig.

b) Hitzeresistenz.

Die reiche Phycomycetenflora der Tropen (vgl. SÖRGEL, 1941) zeigt, daß die Phycomyceten im allgemeinen wohl wärmeliebend sind. Erdtemperaturen von 30° C und mehr, im Extrem bis 39° C, kommen nach HARDERS Messungen in Westindien vor (SÖRGEL), besonders bei starker Sonneneinstrahlung. Es ist deshalb interessant, der oberen Temperaturgrenze nachzugehen, bei der diese Pilze noch lebend bleiben.

Für die Untersuchungen wurden die einzelnen Pilze aus den Stammkulturen mit 1 cem nicht steriler oder sterilisierter feuchter Erde vermischt und in sterile Reagenzgläser gebracht; außerdem wurde von jedem Pilz eine Probe in 1 cem abgekochtem Leitungswasser, ebenfalls im Reagenzglas, mituntersucht. Die Reagenzgläser wurden mit Wattepfropfen verschlossen. Die Gläser wurden im Thermostaten Temperaturen von 40° C an aufwärts ausgesetzt. Zur besseren Kontrolle befand sich in einem der Reagenzgläser ein Thermometer, das anzeigte, wann sich die Erdprobe auf die gewünschte Temperatur eingestellt hatte. Erst von da ab wurde die Zeitdauer gemessen, bei der die Kulturen in der vorgesehenen Temperatur verbleiben sollten. Z. B. wurden in einem bestimmten Fall die Gläser um 10 Uhr 50 in den Thermostaten gebracht, der auf 50° C stand; es dauerte bis 11 Uhr 25, bis die Erden auch die Temperatur von 50° C angenommen hatten. Von da ab wurden die Erden noch 1 Stunde im Thermostaten gelassen. Nach Ablauf der Versuchszeit wurden die Gläser aus dem Thermostaten herausgenommen und nach erfolgter Abkühlung auf Zimmertemperatur in Petrischalen mit Wasser und Ködern angesetzt. Waren die neu ausgestreuten Köder nach 14 Tagen nicht infiziert, so galt das Ergebnis als negativ.

Nach Aufenthalt von 1 Stunde bei 40° waren die Pilze alle noch am Leben. Bei 50° waren es außer *Nowakowskiella* die *Saprolegniaceen*,

die diese Temperatur nicht mehr überstanden. Das Gleiche gilt für die Serie bei 55°. Nach 1stündiger Behandlung mit 60° war auch *Pythium* eingegangen. Als ziemlich hitzebeständig erwiesen sich *Rhizophidium pollinis*, *Rhizophidium* sp., *Rhizophlyctis rosea* und *Allomyces*, die noch Temperaturen von 70 bzw. 65° aushielten; bei 75° gingen aber auch sie innerhalb einer halben Stunde zu Grunde (Tab. V).

Tabelle V. Lebensfähigkeit der Pilze nach Aufenthalt bei 40–75° C
+ lebend, — abgestorben.

	40°, 1 St.		50°, 1 St.		55°, 1 St.		60°, 1 St.		65°, 1 St.		70°, ½ St.		70°, 1 St.		75°, ½ St.	
	Erde	Wasser	Erde	Wasser	Erde	Wasser	Erde	Wasser	Erde	Wasser	Erde	Wasser	Erde	Wasser	Erde	Wasser
<i>Rhizophidium poll.</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	—	—	—
„ sp.	+	+	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	—	—
<i>Rhizophlyctis ros.</i>	+	+	+	—	+	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Nowakowskiella eleg.</i>	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Allomyces jav.</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	—	—	—	—	—
<i>Thraustotheca clav.</i>	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Dictyuchus</i>	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Saprol. Thureti</i>	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Aphanomyces scaber</i>	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Pythium de Baryanum</i>	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Zuerst verloren immer die in Wasser befindlichen Kulturen ihre Lebensfähigkeit, während die in Erde übertragenen Pilze noch höhere Temperaturen ertrugen. Unterschiede zwischen sterilen und nicht sterilen Erdproben waren nicht zu verzeichnen.

c) Kälteresistenz.

Für die systematischen Bodenuntersuchungen wurden auch Proben im Winter gesammelt. So am 31. I. 45 eine Erdprobe aus dem Botanischen Garten in Göttingen, nachdem 5 Wochen Frost geherrscht hatte. Die Erde war vollkommen durchgefroren. In ihrem Gehalt an *Phycomyceten* zeigte sich aber kein Unterschied gegen den Sommer, wo derselbe Standort bereits untersucht worden war. Es schien danach lohnend, die Kälteresistenz unserer *Phycomyceten* etwas näher zu untersuchen.

Die Herstellung der verschiedenen Temperaturstufen wurde dadurch erschwert, daß für die Eismaschine und einen elektrischen Kühltank die notwendigen Kühlflüssigkeiten nicht zu beschaffen waren. Es mußte daher zu einer primitiveren Methode gegriffen werden. In einer mit Sägespänen gefüllten Kiste befand sich in der Mitte ein Eimer, in welchen die Kältemischung (zunächst Eis und Kochsalz, später für tiefere Temperaturen Kohlensäureschnee) eingefüllt wurde. Ein Einsatz in dem Eimer hielt die Röhrchen mit den Pilzen so, daß deren untere Enden frei in das Kältebad eintauchten. Es wurden nicht Reagenzgläser, sondern Röhrchen aus Zinkblech, die oben mit einem Gummistopfen verschlossen waren, verwendet; sie

leiten die Kälte besser als Glasröhren. Im übrigen wurde wie bei den Hitze-resistenzversuchen von jedem Pilz je eine Probe in nicht steriler und steriler, feuchter Erde und in Wasser in ein Röhrchen gebracht. Ein Thermometer zum Ablesen der Temperatur befand sich in der Mitte des Einsatzes und ragte mit seinem unteren Ende genau so weit in das Kältebad wie die Röhrchen. Als Deckel wurde über die Kiste zunächst eine Linoleumplatte, und dann noch ein Sack mit Holzwolle gelegt, so daß die Temperaturisolierung ziemlich gut war. Das Thermometer ragte durch die Linoleumdecke etwas heraus, so daß zum Ablesen der Temperatur nur der Sack schnell entfernt zu werden brauchte.

Versuch mit Eis und Kochsalz als Kältemischung: Am 11. VII. 46 kam um 12 Uhr der Einsatz mit den Röhrchen in das Kältebad. Die Temperatur war zunächst -15°C , sank bis 12.30 Uhr auf -18°C , bis 13 auf -19°C und hatte um 14 Uhr -20°C erreicht. Bis abends 21 Uhr blieb die Temperatur hier stehen, am nächsten Morgen um 8 Uhr betrug sie noch -9°C , worauf der Versuch abgebrochen wurde. Die Röhrchen wurden einige Zeit bei Zimmertemperatur zum Auftauen stehen gelassen, und dann wurde ihr Inhalt in Petrischalen entleert und wie üblich angesetzt.

Die Pilze waren also mindestens 7 Stunden der Temperatur von -20°C ausgesetzt gewesen. Ein Teil der angesetzten Schalen zeigte keine Pilzentwicklung mehr. Wie aus Tabelle VI hervorgeht, waren es wieder die *Saprolegniaceen* und *Nowakowskiella*, die empfindlich waren und diese Temperaturen nicht mehr überstanden, aber auch *Allomyces*, der sich gegen Hitze verhältnismäßig unempfindlich gezeigt hatte, war bereits nicht mehr lebensfähig. Die übrigen *Chytridiales* waren weitgehend unempfindlich. Wieder zeigte sich analog den Hitzeresistenzversuchen, daß die Pilze in Wasser empfindlicher waren als in Erde.

Tabelle VI. *Lebensfähigkeit der Pilze nach mindestens 7 stündigem Aufenthalt bei -20°C .*
+ lebend, — abgestorben.

	Erde	Wasser
<i>Rhizopodium pollinis</i>	+	—
„ sp.	+	—
<i>Rhizophlyctis rosea</i>	+	+
<i>Nowakowskiella elegans</i>	—	—
<i>Allomyces javanicus</i>	—	—
<i>Thraustotheca clavata</i>	—	—
<i>Dictyuchus</i>	—	—
<i>Saprolegnia Thureti</i>	—	—
<i>Aphanomyces scaber</i>	—	—
<i>Pythium de Baryanum</i>	+	—

Die Gattungen, die ungeschädigt geblieben waren, wurden nun eine Stunde lang der Temperatur von -86°C (Kohlensäureschnee) ausgesetzt. *Rhizopodium pollinis*, *Rhizopodium sp.* und *Rhizophlyctis rosea* waren auch gegen diese Temperatur resistent, während *Pythium* abgetötet wurde (Tab. VII).

Tabelle VII. Lebensfähigkeit der Pilze nach 1 stündig. Aufenth. bei -86°C .
+ lebend, — abgestorben.

	Erde	Wasser
<i>Rhizophidium pollinis</i>	+	—
" sp.	+	—
<i>Rhizophlyctis rosea</i>	+	—
<i>Pythium de Baryanum</i>	—	—

Die drei überlebenden Gattungen wurden nun in die Temperatur von flüssiger Luft gebracht. Eine Serie blieb 5, eine zweite 15 und eine dritte 60 Minuten darin. Wie Tabelle VIII zeigt, waren die drei Gattungen auch nach 1-stündigem Aufenthalt in der Temperatur der flüssigen Luft (-180 bis 190°C) durchaus nicht abgetötet.

Tabelle VIII. Die Ergebnisse nach 5, 15 und 60 Minuten Aufenthalt in flüssiger Luft (Temp. -180 bis 190°C).

	5 Min. Erde		15 Min. Erde		60 Min. Erde	
	nst. ¹⁾	st. ²⁾	nst.	st.	nst.	st.
<i>Rhizophidium pollinis</i>	+	+	+	+	+	+
" sp.	+	+	+	+	+	+
<i>Rhizophlyctis rosea</i>	+	—	+	—	—	+

¹⁾ nst. = nicht sterilisiert. ²⁾ sterilisiert.

Rhizophlyctis rosea war allerdings in mehreren Röhrchen nicht mehr entwicklungsfähig, und auch aus den anderen fand nur eine sehr spärliche Entwicklung auf den Ködern statt und bestand nur aus ganz vereinzelt Sporangien. *Rhizophidium pollinis* und *Rhizophidium sp.* waren dagegen noch voll entwicklungsfähig und zeigten sich somit recht resistent gegen niedrige Temperaturen.

Ob Dauerorgane die Resistenz gegen die ungünstigen Außenfaktoren bedingen wurde nicht untersucht.

VI. Untersuchungen westindischer und ostindischer Erdproben, die mehrere Jahre trocken lagerten.

Wie die Resistenzversuche ergeben haben, sind verschiedene Arten gegen Austrocknung ziemlich unempfindlich. Ob solche Formen in völlig getrockneten Böden, die in diesem Zustand schon seit Jahren aufbewahrt worden waren, auch noch keimfähig sind, sollten Untersuchungen west- und ostindischer Böden zeigen.

Bei den westindischen Böden handelt es sich um die von HARDER 1937 gesammelten und von SÖRGEL 1937 bis 39 bearbeiteten Erdproben, die nun 8 Jahre alt waren. Von 48 verschiedenen Erden wurden in der

oben beschriebenen Weise je drei Ansätze, also insgesamt 144, gemacht. Aus ihnen wurden isoliert:

<i>Rhizophidium pollinis</i>	24 mal	<i>Pythium</i>	19 mal
<i>Rhizophlyctis rosea</i>	34 „	<i>Mucoraceen</i>	27 „
<i>Nowakowskiella</i>	5 „	<i>Höhere Pilze</i>	33 „
<i>Allomyces jav.</i>	5 „		

Die Erdproben aus Ostindien waren 1939 von Herrn A. Ulmke in der Umgebung von Makassar, Niederländisch-Indien, gesammelt worden. Aus 37 Erden wurden in 148 Ansätzen folgende Pilze isoliert:

<i>Olpidium sp.</i>	2 mal	<i>Allomyces arbusculus</i>	18 mal
<i>Rhizophidium pollinis</i>	105 „	<i>Pythium</i>	87 „
<i>Rhizophidium sp.</i>	32 „	<i>Mucoraceen</i>	95 „
<i>Rhizophlyctis rosea</i>	109 „	<i>Höhere Pilze</i>	79 „
<i>Nowakowskiella</i>	28 „		

Auffällig ist bei den ostindischen Böden die Häufigkeit von *Rhizophidium pollinis*. Auch *Allomyces* trat wesentlich häufiger in tropischen Böden als in deutschen auf, wo er im ganzen nur 5 mal gefunden wurde. Aus westindischen Böden wurde nur die Gattung *Allomyces javanicus* isoliert, während in den ostindischen Böden stets *Allomyces arbusculus* (syn. *Knipii* Sörgel) auftrat. Ein Pilz (hier als *Olpidium sp.* bezeichnet) wurde zweimal aus einem ostindischen Boden isoliert; er trat im Innern von Pollen von *Pinus* auf.

Etwas verwunderlich ist zunächst das Vorkommen von *Nowakowskiella* in den völlig ausgetrockneten Böden, zeigten doch die Trockenresistenzversuche ein negatives Ergebnis. Es gibt von *Nowakowskiella* mehrere Arten. *Nowakowskiella elegans* (SCHROETER 1892), welcher keine Dauerorgane besitzt, und *Nowakowskiella ramosa* (BUTLER) mit Dauerorganen. Es muß sich in den west- und ostindischen Böden wohl um *Nowakowskiella ramosa* handeln, die auf Grund des Besitzes von Dauersporangien das völlige Austrocknen überstehen konnte. Bei den Resistenzversuchen wurde die aus den deutschen Böden isolierte *Nowakowskiella elegans* benutzt, die sich demzufolge als wenig widerstandsfähig erwies.

VII. Besprechung der Ergebnisse.

Bereits seit einigen Jahren weiß man, daß niedere *Phycomyceten*, die ihrem Habitus entsprechend eigentlich typische Bewohner des Wassers sein sollten, vielfach auch aus Erde isoliert werden können. In Deutschland konnten HÖHNK-Bremen (1934/35) und RICHTER-Marburg (1936/37) besonders für die *Saprolegniaceen* eine allgemeine Verbreitung in den von ihnen untersuchten Gebieten feststellen. Veröffentlichungen über systematische Untersuchungen über die übrigen niederen *Phycomyceten* des Bodens liegen für Deutschland noch nicht vor. Doch sind auf Anregung HARDERS solche Untersuchungen bereits von ELISABETH ALDEKAMP durchgeführt, wenn auch nicht publiziert worden. Lediglich eine kurze Mitteilung über die wesentlichen Ergebnisse ist von HARDER (1948) zusammen mit einem kurzen Bericht über die vorstehenden Resultate veröffentlicht worden. Die ALDEKAMPSchen

Ergebnisse decken sich in allen Punkten mit den eigenen; es ist ihr aber gelungen, außer den 16 oben besprochenen *Phycomyceten* noch 5 weitere Gattungen, nämlich *Olpidiopsis* (*spec.*), *Amoebochytrium* (*rhizidioides*), *Aphanomyces* (*scaber* und *stellatus*), *Isoachlya* (*unispora*) und *Leptolegnia* (*caudata*) zu isolieren, während sie *Olpidium* nicht gefunden hat. Im Gegensatz zu Deutschland sind in Amerika schon öfter niedere *Phycomyceten* in größerem Umfang aus dem Erdboden isoliert worden (BUTLER 1907, HARVEY 1925, RAPER 1928, WOLF 1939). Aus SÖRGELS (1941) gründlichen Untersuchungen geht die allgemeine Verbreitung niederer *Phycomyceten* in westindischen Böden klar hervor. SÖRGEL konnte dabei feststellen, daß einige Gattungen, die bisher als sehr selten galten, recht häufig im Erdboden vorkommen.

Bei der vorstehenden Untersuchung der deutschen Böden sind von ALDEKAMP und mir 21 Gattungen isoliert worden, das ist im Vergleich zu den tropischen Böden ein geringeres Ergebnis. So fand SÖRGEL in westindischen Böden 29 Gattungen.

Ob dabei die höhere Temperatur in den Tropen eine wesentliche Rolle spielt (sämtliche Kulturen zeigten die günstigste Entwicklung bei 20—27° C), bedarf noch eingehenderer Untersuchung.

Zweifellos werden bei Erweiterung der Untersuchungen auch noch eine Anzahl weiterer Gattungen gefunden werden; bei der dichten Überwucherung der Köder durch die verbreitetsten Arten, ist es oft sehr schwer, nur vereinzelt vorkommende Formen nicht zu übersehen. Sie werden aber, auch wenn noch weitere gefunden werden, dann doch im allgemeinen als selten gelten müssen.

Über das Vorkommen von *Rhizophidium pollinis* in Erde ist bisher, soweit mir die Literatur zugänglich war, nichts bekannt. Umso auffallender ist seine Häufigkeit in deutschen Böden. Von ZOPF (1887) ursprünglich beschrieben, wurde *Rhizophidium pollinis* bisher nur aus Flüssen, Bächen, Teichen oder Tümpeln isoliert und daher zu den Wasserbewohnern gerechnet.

MÜLLER (1911) vermutet, daß, wegen des ausgesprochenen Sauerstoffbedürfnisses der Zoosporen von *Rhizophidium pollinis*, dessen eigentlicher Verbreitungsort auf der Oberfläche von Gewässern und nicht auf deren Boden sein müsse. Dabei gelang es ihm selbst erst nach einigen Mühen, in bestimmten Tümpeln das gewünschte Material zu finden, während unsere Untersuchungen gezeigt haben, daß man *Rhizophidium pollinis* sehr leicht aus dem Erdboden isolieren kann. Außer auf Pollen von *Pinus* wächst der Pilz auch noch auf Pollen anderer Pflanzen, z. B. von *Phlox*, *Tropaeolum*, *Helianthus*, *Populus* und *Amaryllis* (ZOPF, 1887), und unsere eigenen Untersuchungen zeigten, daß er auch auf Pollen von *Alnus*, *Corydalis*, *Saxifraga*, *Tulipa*, *Narcissus*, *Fritillaria*, *Paeonia*, *Rosa* und *Chrysanthemum* übertragen werden kann. MÜLLER gelang es, den Pilz auch auf andere Substrate, am besten auf abgetötete Wurzelhaare von *Sinapis* zu bringen. Nicht abgetötete Wurzelhaare wurden nicht infiziert. Diese Feststellung berechtigt ihn zu der Annahme, daß das gewöhnliche Substrat des Pilzes, der wohl hauptsächlich als Saprophyt und nur gegebenenfalls als Parasit anzusehen ist, abgestorbene Pflanzenzellen sein müssen und nicht unbedingt Pollenkörner.

Rhizophlyctis rosea, die nach den bis 1938 vorliegenden Untersuchungen als sehr selten galt, kann als allgemein sehr verbreitet, besonders an trockenen Standorten angesehen werden, wie SÖRGEL auch für westindische Böden feststellte, während *Nowakowskiella elegans*, auch recht verbreitet, mehr an feuchten Standorten auftritt.

Von den *Blastocladales* trat in unseren Untersuchungen nur die Gattung *Allomyces* auf, und zwar verhältnismäßig sehr selten. Bisher wurde *Allomyces* in Europa lediglich in Portugal gefunden, sonst kommt er in Amerika, Afrika und Indien vor, und zwar vorwiegend in tropischen Gebieten. Er scheint also wärmere Gebiete zu bevorzugen, wodurch sein seltenes Auftreten in deutschen Böden verständlich würde. Verwandte Formen wie *Blastocladia*, *Blastocladella* (MATTHEWS 1937, HARDER und SÖRGEL 1938) oder *Sphaerocladia* (STÜBEN 1939) konnten nicht isoliert werden; dabei ist *Sphaerocladia* nach SÖRGEL in westindischen Böden durchaus nicht selten. Es scheint sich bei diesen Gattungen ebenfalls hauptsächlich um Vertreter der tropischen Klimate zu handeln; jedenfalls können die Ergebnisse der Resistenzversuche, bei denen sich *Allomyces* als ziemlich empfindlich gegen niedrige Temperaturen zeigte, diesen Schluß nur unterstützen.

Der häufigste Vertreter der *Saprolegniales* bei unseren Untersuchungen ist *Aphanomyces*. Die Feststellung von NIETHAMMER (1937), daß er häufig in Böden, welche mit Rüben bestanden sind, vorkommt, kann bestätigt werden. Er wurde mehrfach aus Rübenäckern isoliert, ebenso aus einem Getreideacker, der im Vorjahr mit Rüben bepflanzt war.

Von der Gattung *Saprolegnia* wurde mit Sicherheit nur *Saprolegnia Thureti* bestimmt, die immerhin nicht ganz selten war. Im allgemeinen gilt aber wohl HÖHNKS Feststellung, nach der jedem Sporulationsmodus eine bestimmte Umgebung entspricht, so daß deshalb auch relativ wenig Gattungen isoliert werden konnten.

In ökologischer Hinsicht haben unsere Untersuchungen keine weitgehenden Aufschlüsse erbracht. Die mannigfachen Faktoren, wie Luftfeuchtigkeit, Wind, Temperatur, Laubdecke usw., die nach FRIEDRICH (1940) für die höheren Pilze von Bedeutung sind, ferner die Art der Bäume und der bodenbedeckenden Krautschicht am Standort, die nach HAAS (1933) bei Mykorrhizabildung sehr wichtig sind, scheinen ohne Einfluß auf die Verteilung der niederen *Phycomyceten* zu sein. Während oft angegeben ist, daß höhere Pilze saure Böden bevorzugen sollen, konnte A. RIPPEL (1940) bei *Aspergillus niger* feststellen, daß dieser sowohl auf sauersten wie auf Carbonatböden vorkommt. Auch die niederen *Phycomyceten* stellen an die Bodenreaktion keine besonderen Ansprüche (LUND 1934). Übereinstimmend mit den vorstehenden Ergebnissen schreibt GREIS (1943), daß *Pythium debaryanum* in Böden von pH 3,5 bis 9,5 vorkommt. Eine gewisse Bedeutung hat dagegen auch für die *Phycomyceten* die Bodenstruktur. Nach NIETHAMMER sind locker gelagerte Böden wie Sandböden meist reicher an Pilzen als dicht gelagerte Lehm Böden, während nach Ansicht von GREIS (1943) gerade Sandböden pilzärmer als Lehm Böden sind. Für die niederen *Phycomyceten* stimmen unsere Ergebnisse mit den Angaben von GREIS überein. Bindige Lehm Böden sind meist feuchte Böden, dies dürfte wohl in erster Linie ausschlaggebend für die *Phycomyceten* sein, während die an sich gröbere und

damit besser durchlüftete Struktur der Sandböden für die *Phycomyceten* wohl erst in zweiter Linie eine Rolle spielt.

Überraschend ist die relativ große Widerstandsfähigkeit unserer zarten „Algen“-Pilze gegen Austrocknung, Hitze und Kälte. *Rhizophidium pollinis* und eine andere *Rhizophidium*-Art sowie *Rhizophlyctis rosea*, *Allomyces* und *Pythium* entwickelten sich noch aus seit 8 Jahren in nicht luftdicht verschlossenen Schachteln aufgehobener und völlig austrockneter Erde; man darf wohl vermuten, daß sie auch nach noch längerer Zeitdauer lebensfähig wären. Andere Formen, so *Nowakowskiella elegans*, *Thraustotheca*, *Dictyuchus*, *Saprolegnia* und *Aphanomyces* gingen bei unseren Austrocknungsversuchen schon innerhalb von 14 Tagen zugrunde.

Die Widerstandsfähigkeit gegen Hitze ist bei den niederen *Phycomyceten* offenbar nicht sehr groß, aber einige von ihnen (*Rhizophidium pollinis*, *Rhizophidium sp.* und *Allomyces*) können doch Temperaturen bis zu 70° C ertragen.

Gegen Kälte scheinen Pilze mindestens teilweise nur wenig empfindlich zu sein: so fand KÄRCHER (1931), daß verschiedene Pilze, u. a. *Hefe* und *Aspergillus niger*, durch 13-stündigen Aufenthalt in flüssiger Luft nicht abgetötet wurden, und nach MACFADYEN (1907) verlieren *Schimmelpilzsporen*, die 1 Woche lang in flüssige Luft gebracht wurden, ihre Keimkraft keineswegs. Bei unseren Untersuchungen erwiesen sich *Rhizophidium pollinis*, *Rhizophidium sp.* und *Rhizophlyctis rosea* nach 1-stündiger Behandlung mit flüssiger Luft als noch nicht abgetötet. *Nowakowskiella*, *Allomyces*, *Thraustotheca*, *Dictyuchus*, *Saprolegnia* und *Aphanomyces* gingen aber schon durch 7-stündigen Aufenthalt bei — 20° zugrunde.

Die niederen *Phycomyceten* stellen offenbar geringe Ansprüche an das Substrat und die Außenbedingungen, wodurch sich ihre allgemeine, starke Verbreitung verstehen läßt. Es läßt sich bei ihnen innerhalb Deutschlands auch kein Unterschied in der geographischen Verteilung nachweisen, wie ihn etwa RIPPEL für *Aspergillus niger* feststellen konnte, dessen Häufigkeit vom nördlichen zum südlichen Deutschland zunimmt. Sie sind nicht wie viele höhere Pflanzen an ganz bestimmte Biotope gebunden, wenn sie auch manchmal gewisse Standorte bevorzugen, wie z. B. *Rhizophlyctis rosea*, die häufiger in trockenen als in feuchten vorkommt.

VIII. Zusammenfassung.

144 Erdproben aus verschiedenen Teilen und Örtlichkeiten Deutschlands wurden auf ihren Gehalt an niederen *Phycomyceten* untersucht. Dazu wurden die Erden in Wasser aufgeschwemmt und Köder hinzugegeben, auf denen sich dann die Pilze entwickelten. Im ganzen wurden 1615 Ansätze gemacht. Dabei ergab sich:

1. Niedere *Phycomyceten* waren in nahezu jeder Erde vorhanden.
2. Ihre Verbreitung über das untersuchte Gebiet ist ziemlich gleichmäßig.

3. Die häufigsten Vertreter waren *Pythium*, *Rhizophlyctis*, *Rhizophidium* und *Nowakowskiella*. Außerdem wurden *Pseudolpidium*, *Ol-*

pidium, *Pleolpidium*, *Cladochytrium*, *Allomyces*, *Thraustotheka*, *Dictyuchus*, *Brevilegnia*, *Saprolegnia*, *Achlya*, *Aphanomyces* und *Pythiomorpha* gefunden.

4. In 1 cem Erde waren bei rund $\frac{1}{4}$ der Böden 5 Gattungen enthalten (häufigst vorkommende Anzahl); völlig pilzfrei waren nur 3 Proben; und in je 1 waren 9 bzw. 10 Gattungen vorhanden.

5. Waldboden erwies sich als arm an niederen *Phycomyceten*, dasselbe gilt für unbearbeitetes, unkultiviertes Land; dagegen sind Gebiete, die mit Mensch und Vieh in Berührung kommen, wesentlich stärker besiedelt.

6. Feuchte Standorte waren besonders reich an *Phycomyceten*. Zeitweise stark austrocknende Standorte zeigten jedoch auch ein durchaus beachtliches Pilzvorkommen.

7. Lehmböden waren von *Phycomyceten* stärker besiedelt als Sandböden.

8. Eine Abhängigkeit in der Häufigkeit der niederen *Phycomyceten* von der Bodenacidität scheint nicht zu bestehen.

9. Die Resistenz gegen Trockenheit ist bei einigen Formen sehr groß. *Rhizophidium*, *Rhizophlyctis*, *Nowakowskiella*, *Allomyces* und *Pythium* waren noch aus 8 Jahre trocken aufbewahrten Böden herauskultivierbar.

10. Von *Rhizophidium* und *Allomyces* werden Temperaturen bis zu 70° C ertragen.

11. Zwei Gattungen der *Chytridiales*, nämlich *Rhizophidium* und *Rhizophlyctis*, besitzen eine große Widerstandsfähigkeit gegen Kälte. Sie sind nach 1-stündigem Aufenthalt in flüssiger Luft noch lebensfähig.

12. Während aus den deutschen Böden 21 Gattungen isoliert wurden, hat SÖRGE (1941) aus westindischen Erden 29 Gattungen herausgezüchtet.

Herrn Professor Dr. RICHARD HARDER danke ich für die Überlassung des Themas und das stete Interesse, welches er dieser Arbeit entgegenbrachte.

Literatur.

BUTLER, E. J.: 1907. An account of the genus *Pythium* and some Chytridiaceae. (Mem. of the Dept. of Agric. in India, Bot. Ser. 1, 1—161).

COKER, W. CH.: 1923. The Saprolegniaceae. CORCH, J. N.: 1939. Technique for collection, isolation and culture of the Chytrids. (Journ. of the Elisha Mitchell Soc. Vol. 55, No. 1) (zit. nach Sörgel).

FITZPATRICK, H. M.: 1930. The lower Fungi. Phycomycetes. — FRIEDRICH, K.: 1940. Untersuchungen zur Oekologie der höheren Pilze. (Pflanzenforschg. 22, v. Kolkwitz).

GREIS, H.: 1943. Bau, Entwicklung und Lebensweise der Pilze. (Engler Prantl. Natürliche Pflanzenfamilien, 2. Aufl. Bd. 5 a, I.).

HAAS, H.: 1933. Die bodenbewohnenden Großpilze in Waldformationen einiger Gebiete von Württemberg. (Beih. Bot. Zentralbl. 2. Abt. Bd. 50.

35—134). — HARDER, R. u. SÖRGE, G.: 1938. Über einen neuen plano-isogamen Phycomyceten mit Generationswechsel und seine phylogenetische Bedeutung. *Nachr. Ges. Wiss. Göttingen, Fachgr. VI, 3. Bd. Nr. 10*, 119—127. HARDER, R., 1948. Über das Vorkommen niederer Phycomyceten in deutschen Böden. *Nachr. Akad. Wiss. Göttingen. Math.-Phys. Kl. Biol.-physiol.-chem. Abt. H. 1*, 5—7.

HARVEY, J. V.: 1925. A study of the water molds and Pythiums occurring in the soil of Chapel Hill. (*Journ. of the Elisha Mitchell Soc. Vol. 41*, 151—164) (zit. nach Sörgel). — HÖHNK, W.: 1934/35. Saprolegniales und Monoblepharidales aus der Umgebung Bremens, mit bes. Berücksichtigung der Oekologie der Saprolegniaceae. (*Abh. d. Naturw. Vereins zu Bremen-Bd. 29*, 207—237).

KARCHER, H.: 1931. Über die Kälteresistenz einiger Pilze und Algen (*Planta 14*, 515—516).

LINDAU, G.: 1904—07. Allgemeine Morphologie, Entwicklungsgesch., Anatomie und Systematik der Eumyceten (Lafar, *Handb. d. techn. Mykol. Bd. 1*, 150—221). — LUND, A.: 1934. Studies on danish freshwater Phycomycetes and notes on their hydrogen-ion concentration of the water. (*Kopenhagen Levin und Munksgaard*).

MACFADYEN, A.: 1900. Influence of the Temperature of liquid Hydrogen on Bacterial life. (*Proc. of the Roy. Soc. Bd. 66*). — v. MINDEN, M.: 1915. Kryptogamenflora der Mark Brandenburg. *Bd. 5*. — MÜLLER, F.: 1911. Untersuchungen über die chemotaktische Reizbarkeit der Zoosporen von Chytridiaceen u. Saprolegniaceen. (*Jahrb. wiss. Bot. 49*, 421—521).

NIETHAMMER, A.: 1937. Die mikroskopischen Bodenpilze. (Dr. W. Junk's-Gravenhage).

RAPER, K. B.: 1928. Studies on the frequency of water molds in the soil. (*Journ. of the Elisha Mitchell Soc: Vol. 44*, 133—139) (zit. n. Sörgel). — RICHTER, W.: 1936/37. Vorarbeiten zu einer Saprolegniaceen-Flora von Marburg. (*Flora 131*, 227—262). — RIPPEL, A.: 1940. Über die Verbreitung von *Aspergillus niger*, insbesondere in Deutschland. (*Arch. f. Mikrobiol. Bd. 11*, 1—32).

SÖRGE, G.: 1941. Über die Verbreitung einiger niederer Phycomyceten in Erden Westindiens. (*Beih. z. Bot. Zentralbl. Bd. 61, Abt. B, Heft 1/2*, 1—32). — SPARROW, F. K. jr.: 1943. Aquatic Phycomycetes Univ. of Michigan Studies, *Scient. Ser.*, Vol. 15 (wurde erst nach Abschluß des Manuskripts zugänglich). — STÜBEN, H.: 1939. Über die Entwicklungsgeschichte und Ernährungsphysiologie eines neuen niederen Phycomyceten mit Generationswechsel. (*Planta, Bd. 30*, 353—383).

WINTER, G.: 1892. Rabenhorsts Kryptogamen-Flora *Bd. 1*. — WOLF, F.: 1939. A study of some aquatic Phycomycetes isolated from Mexican soil. (*Mycologia 31*, 376—387). (Zit. nach Sparrow).

ZOPF, W.: 1887. Über einige niedere Algenpilze (Phycomyceten) und eine neue Methode, ihre Keime aus dem Wasser zu isolieren. Halle.

(Aus dem Institut für Pflanzenkrankheiten der Universität Bonn, Direktor
Prof. Dr. E. Schaffnit).

Untersuchungen über die Beziehungen zwischen *Ophiobolus graminis* und anderen Organismen mit Hilfe der Aufwuchsplattenmethode.

Von

A. GERHARD WINTER.

Mit 26 Textabbildungen.

(Eingegangen am 17. Januar 1948).

In einer Reihe früherer Arbeiten ist dargelegt (WINTER 1939, 1942), daß die Entwicklung von *Ophiobolus graminis*, des Erregers der *Ophiobolose* oder Schwarzbeinigkeit des Weizens, im natürlichen Boden durch die Tätigkeit verschiedener Bodenorganismen stark gehemmt wird. Diese Feststellung gilt zunächst für die sogenannten Laufhyphen des Pilzes. Sie tragen die Infektion auf der Wurzeloberfläche voran, entsenden dabei parasitierende Seitenäste in die Wurzel und stellen die parasitische Phase des Pilzes dar. Das gleiche trifft auch für das saprophytische Myzel des Pilzes zu, das sich in Abwesenheit der Wirtspflanze im Boden entwickeln kann (WINTER 1947). Partielle Bodensterilisation mit Hitze oder Chemikalien beseitigt diese Entwicklungshemmung in weitem Umfang¹).

Nach allen bisherigen Feststellungen beruht diese günstige Wirkung partieller Bodensterilisation nicht auf einer Nährstoffaufschließung, sondern auf der Zerstörung antagonistischer Mikroben bzw. ihrer Stoffwechselprodukte oder Toxine. Unentschieden blieb, ob die antagonistische Wirkung auf die Ansiedlung von Bodenmikroben in nächster Nähe der Pilzhypen zurückzuführen ist, die mit ihren Stoffwechselprodukten *Ophiobolus graminis* unmittelbar angreifen, oder ob vielleicht sogar von Parasitismus gesprochen werden kann. Vor allem bestand aber die Möglichkeit, daß die entwicklungshemmenden Stoffe in die Bodenlösung abgeschieden werden, und nach Diffusion und Verteilung im Boden eine summarische Wirkung aller Mikroben resultiert. Das würde also bedeuten, daß die antagonistische Wirkung nicht an eine unmittelbare Nachbarschaft der beiden Partner gebunden ist. Die Abhängigkeit der Laufhyphenentwicklung von der Bodenfeuchtigkeit in verschiedenen Erd-Sand-Gemischen (WINTER 1939b) machte es nun sehr wahrscheinlich, daß die Bodenlösung als solche wesentliche Anteile der antagonistischen Toxine gelöst enthält, ihre Konzentration daher für den Hemmungseffekt erhebliche Bedeutung besitzt. Ein wirklich eindeutiger, unmittelbarer Nachweis dieser Wirkung war jedoch bisher nicht zu erlangen (WINTER 1942).

Eine Klärung dieser Frage war umso dringlicher, als nach den Untersuchungen von WEINDLING (1932, 1934) *Trichoderma lignorum* — allerdings in

¹ Vgl. zur Ökologie und Biologie von *Ophiobolus graminis* insbesondere auch die Arbeiten von GARRETT, die referiert sind bei S. D. GARRETT: The take-all disease of cereals, Imp. Bur. Soil Sci. 1942, Techn. Communication No. 41.

künstlicher Kultur — durch Ausscheidung eines letal wirkenden Stoffes eine antagonistische Wirkung auf *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora parasitica* und andere Parasiten ausübt. Das *Trichoderma*-Myzel sucht die unmittelbare Nähe der genannten Pilze auf, umwächst sie z. T. spiralig, tötet sie mit Hilfe eines Toxins ab und dringt früher oder später in die Hyphen ein.

Es ist aber nicht von der Hand zu weisen, daß derartige Vorgänge, auch im natürlichen Boden, für *Ophiobolus graminis* eine erhebliche Bedeutung besitzen. Voraussetzung für die Entscheidung dieser Frage ist eine Methode, mit deren Hilfe das *Ophiobolus*-Myzel und seine möglichen Antagonisten im natürlichen Boden in unveränderter Lage beobachtet werden können. WINTER (1947) erweiterte nun die *Cholodny*-Methode, indem er pilzdurchwachsene Agarstückchen auf den Objektträger brachte und nach mehr oder minder langem Verweilen im Boden das Wachstum des Pilzes auf der Glasoberfläche beobachtete bzw. maß².

Diese Methode mußte — insbesondere nach Anfärbung der Präparate, auf die bei quantitativen Messungen des Pilzwachstums verzichtet werden konnte — auch zur Beobachtung des Zusammenlebens verschiedener Pilze, also des künstlich auf dem Objektträger in den Boden gebrachten *Ophiobolus* und sich auf dem Objektträger entwickelnder anderer Organismen, benutzt werden können. Dabei ist es sogar möglich, durch das Aufbringen zweier verschiedener bekannter Pilze auf denselben Objektträger ihre gegenseitigen Beziehungen und Beeinflussungen im natürlichen Milieu zu beobachten. Für einleitende Beobachtungen in dieser Richtung schien es angebracht, gerade in solchen Experimenten, die besonders auffallende Unterschiede in der Entwicklung von *Ophiobolus graminis* zeigten, dem Auftreten anderer Bodenmikroben und ihrem Zusammenleben mit *Ophiobolus* erhöhte Aufmerksamkeit zu schenken.

A. Methodisches.

Unsterilisierte und partiell sterilisierte (2 Stunden bei 98° C) Gartenerde (ein leicht sandiger Lehm) mit einem Feuchtigkeitsgehalt von 40% der maximalen Wasserkapazität wurde in Petrischalen gebracht, in die vorher Objektträger eingelegt waren, die auf ihrer Oberfläche jeweils 2 kreisrunde, von *Ophiobolus graminis* bewachsene Agarstückchen von 6 mm Durchmesser trugen (vgl. WINTER 1947). Nach verschiedenen, aus der Abb. 1 zu ersehenden Zeitabständen wurden die Objektträger aus den Petrischalen entfernt und das maximale Wachstum der Hyphen auf der Glasplatte durch Ausmessen der Distanz zwischen Agarrand und den am weitesten vorgedrungenen Spitzen der Hyphen bestimmt. Um jedes Agarstückchen wurde die größte

² Bei einem Besuch in Rothamsted im Mai 1947 ergab sich im Gespräch mit S. D. GARRETT, daß von seinem Schüler BLAIR annähernd die gleiche Methode zur Untersuchung von *Rhizoctonia solani* verwendet wurde. Die Arbeit war mir infolge des Krieges bis dahin unbekannt. Vgl. BLAIR, I. D.: Behaviour of the fungus *Rhizoctonia solani* Kühn in the soil. Ann. Appl. Biol. 30, 118, 1943. Doch erwies sich in eigenen Versuchen diese Methode gerade für *Rhizoctonia solani* als ungeeignet, da die Hyphen nicht auf dem Objektträger haften und bei Verwendung 6 mm großer Impfstücke der Pilz unter allen untersuchten verschiedenartigsten Bedingungen mit Hilfe des Nährstoffvorrats der Plättchen so sark auswächst, daß die ganze Erde über der Glasplatte bis zu einer Höhe von 2 cm durch die Hyphen brotartig verklebt ist.

Ausdehnung mit Hilfe eines Kreutztisches in 4 um jeweils 90° differierenden Richtungen festgestellt. Der Mittelwert aus 30—40 Messungen ist jeweils in der Abb. 1 eingetragen.

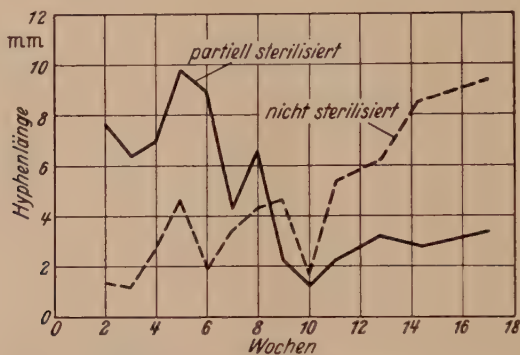


Abb. 1. Hyphenlängen von *Ophiobolus graminis* auf Cholodny-Platten nach verschieden langem Verbleiben in partiell sterilisiertem und natürlichem Boden.

B. Ergebnisse.

Der gegenläufige Charakter des Wachstums in natürlichem und partiell sterilisiertem Boden tritt klar hervor. Zunächst ist das Wachstum im partiell sterilisierten Boden ungleich besser als in natürlicher Erde. Die Entwicklung wird dann aber regelmäßig schlechter, bis die Myzel-ausbreitung viel geringer ist als im unbehandelten Boden. Umgekehrt in natürlicher Erde. Hier nimmt die maximale Hyphenlänge, wenn auch sprunghaft, zu, bis die gefundenen Werte die Myzelentwicklung in partiell sterilisiertem Boden weit übertreffen. Wesentlich zum Verständnis dieses Kurvenverlaufes und einiger, bei seiner näheren Betrachtung auffallender Eigenheiten sind zwei Erscheinungen:

1. Der Pilz wächst³ entweder in Form eines schwachwüchsigen, hyalinen, stark verzweigten, dünnzelligen Myzels, oder er bildet einzelne, kräftigere, dunkelgefärbte, weitauswachsende, wenig verzweigte Hyphen (nach Art der Laufhyphen) aus. In dem partiell sterilisierten Boden entwickelt sich der Pilz aus den Agarstückchen heraus sofort in Form der Laufhyphen, die dementsprechend hohe Wachstumswerte erreichen. Dagegen entstehen in dem natürlichen Boden zunächst hyaline Hyphen, denen erst später Laufhyphen nachfolgen. Ist in dem unsterilen Boden, wie nach 6, 7 und 10 Wochen (vgl. Abb. 1), sehr geringes Wachstum festzustellen, so beobachtet man in jedem Fall das Fehlen von Laufhyphen. Umgekehrt ist bei unverhältnismäßig gutem Wachstum, wie nach 5 Wochen, eine frühzeitige Ausbildung von Laufhyphen festzustellen.

2. Die scheinbar abnehmende Ausbreitung der Laufhyphen in sterilisiertem Boden wird nur durch eine nach wenigen Wochen beginnende Zersetzung des Myzels vorgetäuscht. Sie veranlaßt beim Herausnehmen

³ Das „normale“ Wachstum auf CHOLODNY-Platten zeigt Abb. 18.

der Objektträger aus dem Boden ein Ablösen und Abreißen der abgestorbenen, morschen Hyphen. Hiervon werden die äußeren, jüngsten Teile des Pilzrasens am stärksten betroffen, so daß mit zunehmender Zersetzung eine immer kürzere Hyphenlänge gemessen wird. Die rasche Einstellung des Hyphenwachstums und der frühzeitige Beginn der Zersetzung bedingen im Augenblick der Abtötung nur relativ geringe Altersunterschiede zwischen den ältesten und jüngsten Myzelteilen. Bei der Langlebigkeit der Laufhyphen muß daher das ganze Myzel gleichzeitig von der letalen Einwirkung betroffen worden sein. Dann wird aber das zarte, jüngere Myzel wahrscheinlich der Zersetzung früher anheimfallen.

Zieht man in Erwägung, daß auf die teilweise Zerstörung der Bodenmikroben durch die partielle Sterilisation sehr rasch eine Vermehrung der *Bakterien*- und *Pilzzahlen* auf ein Vielfaches der vor der Sterilisation gemessenen Werte folgt, so wird man sehr leicht vermuten, daß diese Überentwicklung zunächst das Wachstum verhindert und dann zur Zersetzung des wachstumsunfähigen Myzels führt. Es erschien daher angebracht, die Objektträger nach der CHOLODNY-Methode (nach Anfärben mit Erythrosin bzw. LÖFFLERS Methylenblau s. u.) auf Zahl und Art der vorhandenen Mikroben zu untersuchen.

In dem unbehandelten Boden wurde eine Population verschiedener Pilze, *Actinomyceten* und *Bakterien* beobachtet (s. Abb. 4). Dagegen war in dem partiell sterilisierten Boden eine geradezu phantastische Entwicklung von *Actinomyceten* (Abb. 2) eingetreten. Sie wucherten gleichmäßig über den ganzen Objektträger hinweg. Es fehlte so gut wie jedes Wachstum von *Pilzen* und *Bakterien*. Die *Actinomyceten* siedeln sich dabei gerne auf den Hyphen von *Ophiobolus graminis* an (Abb. 3). Auch DEMETER und MOSSEL (1933) haben bereits die Vorliebe der *Actinomyceten* für Pilzhypen beobachtet. Ob es sich hier aber um lebende oder tote Myzelien handelte, wie also das Verhältnis der beiden Partner zu deuten war, haben die beiden Autoren nicht entscheiden können. In unserem Fall war der Objektträger nur 14 Tage im Boden verblieben, und die Aufnahme zeigte Strahlenpilze auf den äußeren, ja den jüngsten Teilen der *Ophiobolus*-Kolonie. Offensichtlich befand sich dieses junge Myzel im Zustand kräftigsten Wachstums (das Wachstum

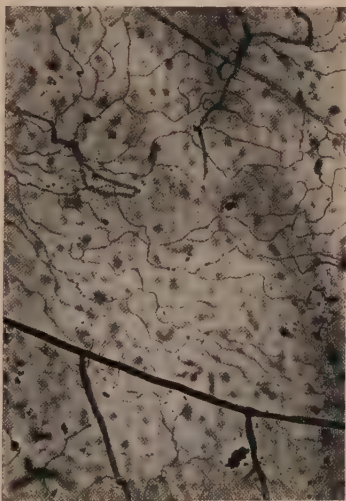


Abb. 2. Überentwicklung von *Actinomyceten* nach partieller Sterilisation. Dazwischen einzelne schon zerfallene *Ophiobolus*-Hyphen. 28 Tage nach dem Einbringen in den Boden. (264 ×).

im partiell sterilisierten Boden ist ja zunächst ausgezeichnet), als es von dem Strahlenpilz überwachsen wurde. Dieser Besiedlung muß überaus rasch das Absterben und die Auflösung der Hyphen gefolgt sein; standen doch, zumal es sich um die jüngsten Teile des Myzels handelte, für die Besiedlung, Abtötung und Zerstörung nur wenige Tage zur Verfügung. Unentschieden muß bleiben, ob diese Abtötung durch Ausscheidung von Antibioticis außerhalb der Pilzhypen oder nach Eindringen des Actinomyceten in die Pilzhypen erfolgt ist. Mikroskopisch und zeitlich ist hierüber keine Entscheidung zu treffen.



Abb. 3. Von Actinomyceten besiedelte zerfallende *Ophiobolus*-Hyphen in partiell sterilisiertem Boden. 14 Tage nach Einbringen der Objektträger in den Boden (252 \times).

Auch solche Myzelteile von *Ophiobolus graminis*, die nicht unmittelbar von Actinomyceten besiedelt waren, stellten ihr Wachstum ein. Darüber hinaus wurde auch, wie die ausschließliche Besiedlung der Objektträger mit Strahlenpilzen zeigt, jegliches Gedeihen anderer Bodenmikroben nach der partiellen Sterilisation verhindert. Die übermäßige Entwicklung von Actinomyceten wirkt also schon nach ganz kurzfristiger Anreicherung von Hemmungsstoffen im Boden antagonistisch auf alle anderen Bodenmikroben.

Somit dürfen wir annehmen, daß die Hemmung des Pilzwachstums und der nachfolgende oder gleichzeitige Zerfall der Hyphen im partiell sterilisierten Boden auf verschiedene Weise verursacht werden kann.

1. Durch Toxinbildung der Actinomyceten, die auch auf größere Entfernung über die Bodenlösung wirkt,

2. durch Toxinausscheidung unmittelbar den Hyphen aufliegender Actinomyceten, die nach dem Tode teilweise in das Myzel eindringen, oder aber — was einwandfrei nicht zu beweisen ist — bereits in dem lebenden Organismus schmarotzen. Zweifelsohne aber müssen wir be-

reits die Abtötung durch unmittelbar aufsitzende Hyphen als Parasitismus bezeichnen, zumal die so abgetöteten Hyphen von dem gleichen Organismus so gut wie ohne Mitwirkung anderer Bodenmikroben zersetzt werden.

Ein vergleichender Gesamtüberblick läßt dabei keinen Zweifel, daß die mittelbare Hemmung und Abtötung des Pilzes durch die in der Bodenlösung vorhandenen antibiotischen, von den *Actinomyceten* in sie abgeschiedenen Stoffe, den weitaus wichtigeren Prozeß darstellen. Auch bei dichtester Besiedlung der Objektträger mit Strahlenpilzen hält sich der Prozentsatz unmittelbar durch *Actinomyceten* besiedelter *Ophiobolus*-Hyphen in bescheidenem Rahmen und darf im Mittel auf 10—20 % geschätzt werden.

Die Hemmung und der spätere Rückgang des Wachstums in partiell sterilisiertem Boden dürfen somit als weitgehend aufgeklärt angesehen werden. Es bleibt zu untersuchen, ob sich die Beeinträchtigung der *Ophiobolus*-Entwicklung im natürlichen Boden auf eine oder mehrere der oben genannten Möglichkeiten zurückführen läßt, nämlich:

- a) Parasitierung durch andere Organismen,
- b) Toxinbildung in unmittelbarer Hyphennähe,
- c) Mittelbare Toxinwirkung durch Ausscheidung in die Bodenlösung.

Für diese Untersuchungen war es von entscheidender Bedeutung, daß die Objektträger einer doppelten Färbung mit Phenylerythrosin und LÖFFLERS Methylenblau unterzogen wurden. *Ophiobolus graminis* nimmt nämlich Erythrosin kaum an, während andere Bodenorganismen stärker mit Phenylerythrosin als mit dem Methylenblau angefärbt werden können. Insbesondere wurde nach der Phenylerythrosinfärbung kein Methylenblau mehr durch die weit überwiegende Zahl der *Bodenpilze* aufgenommen. Die Färbung wurde in der Weise durchgeführt, daß die Objektträger nach der Phenylerythrosinbehandlung mit Leitungswasser abgespült und in Methylenblau übergeführt wurden. Die Dauer der Färbung konnte ohne Beeinträchtigung der Resultate weitgehend variiert werden. Auf diesem Wege wurden sehr kontrastreiche Bilder erhalten, die eine außerordentlich gute Beobachtung der Beziehungen von *Ophiobolus graminis* zu anderen *Bodenpilzen* und *Bakterien* ermöglichen und insbesondere auch bei dichtester Aneinanderlagerung von *Ophiobolus graminis* und anderen *Pilzen* eine Unterscheidung der Partner erlauben.

Die Zusammensetzung der Bodenmikroflora erwies sich wie erwähnt im Vergleich zu der partiell sterilisierten Erde als völlig anders geartet. Die Abb. 4 gibt davon eine gute Vorstellung. Es handelt sich bei den großen Zellen um Myzel von *Ophiobolus graminis*, das sklerotialen Charakter hat und von *Pilzen*, *Actinomyceten* und *Bakterien* dicht besiedelt ist. Von einer einseitigen Entwicklung bestimmter Organismen ist auf sämtlichen untersuchten CHOLODNY-Platten nichts zu bemerken; in allen Bereichen treten Pilzhypen, Bakterienkolonien und Strahlenpilze auf, ohne daß über größere Flächen hin eine Art vorherrscht.

Die Oberfläche der Hyphen, und zwar auch junger, wachstumsfähiger, sich noch entwickelnder Myzelien ist über weite Strecken hin mit *Bakterien* dicht besetzt. Schon DEMETER und MOSSEL (1933, S. 88) beschreiben Anhäufungen von *Bakterien* an absterbenden und lebenden

Hyphen. Ganz offensichtlich bieten die Ausscheidungen oder die Überreste der Hyphen einigen *Bakterien* günstige Wachstumsbedingungen. Es darf aber keinem Zweifel unterliegen, daß die Hyphen ihrerseits unter solchen Umständen einer eventuellen antibiotischen Wirkung durch die *Bakterien* besonders stark ausgesetzt sind. Das gleiche gilt hier wie im partiell sterilisierten Boden für die *Actinomyceten*, deren hyphotrope Eigenschaften auch hier wieder deutlich in Erscheinung treten.



Abb. 4. Zertallende sklerotiale Hyphenknäule von *Ophiobolus graminis* in natürlichem Boden. Dichte Besiedlung der Hyphen und des Objektträgers mit *Actinomyceten* und verschiedenen *Bakterienkolonien* (552 \times).

Die Strahlenpilze sind hier allerdings im wesentlichen auf die *Ophiobolus*-Hyphen beschränkt. „Freies“ *Actinomyceten*-Myzel ist eigentlich nur „auf dem Weg“ von einer *Ophiobolus*-Hyphe zur anderen zu beobachten.

Ganz besonderes Interesse verdient aber die gegenseitige oder einseitige Beeinflussung verschiedener *Pilze*. Es zeigt sich nämlich, daß zwischen *Ophiobolus graminis* und einer Reihe verschiedener *Bodenpilze* aus der Klasse der *Phycomyceten* und *Eumyceten* engste Beziehungen bestehen. Zumeist ändert *Ophiobolus graminis* seine Wuchsform beim Zusammentreffen mit anderen *Pilzen* nicht, sie üben also keine Anziehungskraft auf ihn aus. Dagegen paßt sich der Partner — durch irgendwelche Tropismen geführt — der Wuchsform von *Ophiobolus graminis* mehr oder weniger stark an, so daß er streckenweise gar nicht, oder trotz der verschiedenen Färbung nur sehr schwer zu erkennen ist. Die verschiedenartigen Beziehungen zwischen den *Bodenpilzen* und

Ophiobolus graminis werden im folgenden am anschaulichsten an Hand von Mikrophotographien dargelegt.

Vorher sei nochmals darauf hingewiesen, daß die Identifizierung des *Ophiobolus*-Myzels in jedem Falle trotz fehlender Fruktifikation sichergestellt ist. Es ist nach einiger Übung bei Ausbildung der dunklen Laufhyphen mit absoluter Zuverlässigkeit an seinem Habitus erkenntlich. Außerdem kann seine Identität durch den Nachweis der Entstehung aus den Hyphen des auf den Objektträger gebrachten Impfstückes erwiesen werden. DEMETER und MOSSEL schlugen, um dieses Ziel zu erreichen, die Sterilisierung des Bodens und Beimpfung mit Reinkulturen eines Pilzes oder Bakteriums vor. Dabei waren sie sich der praktischen und theoretischen Schwierigkeiten bewußt, die ein solches Verfahren durch die große Infektionsgefahr und völlige Veränderung des Bodens infolge Sterilisation in sich birgt. Der ganze Vorteil der von WINTER (1947) eingeführten Verbesserung der CHOLODNY-Methode durch Aufbringen des pilzdurchwachsenen Agarstückchens auf die Objektträger erweist sich bei diesen Versuchen. Es wird ein Einblick in die wirklichen, im natürlichen Boden vorhandenen Verhältnisse gewonnen, die der Untersuchung bisher unzugänglich waren.

Eine verhältnismäßig lockere Bindung eines *Phycomyceten* an *Ophiobolus*-Hyphen zeigt die Abb. 5. Das Myzel des *Phycomyceten*

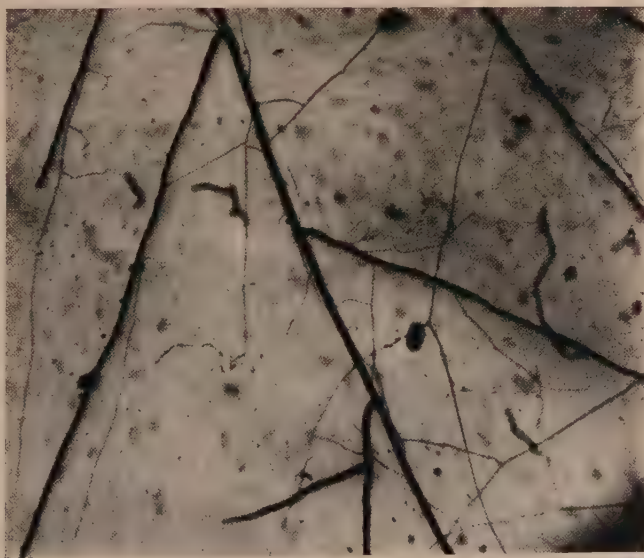


Abb. 5. *Phycomyceten*-Myzel von einer *Ophiobolus*-Hyphe zur anderen wachsend und diese streckenweise begleitend. 63 Tage nach Einbringen der Objektträger in natürlichen Boden (264 X).

zieht sich geradlinig und spinnwebartig von einer zur anderen dunkler gefärbten und kräftigeren *Ophiobolus*-Hyphe. Es wird an derselben oft um 90° aus der ursprünglichen Richtung abgelenkt, wächst eine mehr oder minder lange Strecke parallel mit den *Ophiobolus*-Zellen, um sich dann wieder aus ihrem Bereich herauszugeben. Die Abb. 6 gibt

einen stärker vergrößerten Ausschnitt mit dem gleichen Begleitpilz. Man erkennt eigenartige fingerförmige Verzweigungen des *Phycomyceten* und kann vor allem das Heranwachsen und Anlegen an die *Ophiobolus*-Hyphen gut beobachten. In ihrem weiteren Verlauf liegen dann die helleren Hyphen streckenweise so dicht unter den *Ophiobolus*-Zellen, daß sie nicht zu erkennen sind. *Bakterienanhäufungen* in Hyphen-nähe sind gleichfalls zu beobachten.

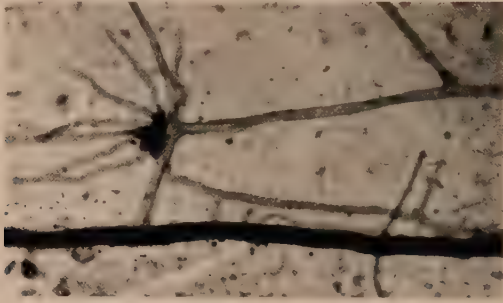


Abb. 6. Dasselbe Myzel wie in Abb. 5. Heranwachsen der Hyphen an *Ophiobolus graminis* (252 \times .)

Einen *Phycomyceten* anderer Wuchsform mit kräftigeren Hyphen zeigt die Abb. 7. Die Bindung an *Ophiobolus* ist auch in diesem Falle

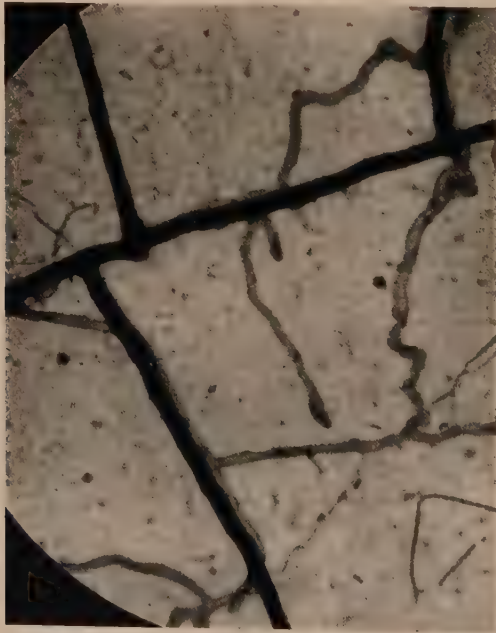


Abb. 7. Das helle *Phycomyceten*-Myzel paßt sich den *Ophiobolus*-Hyphen streckenweise an (252 \times).

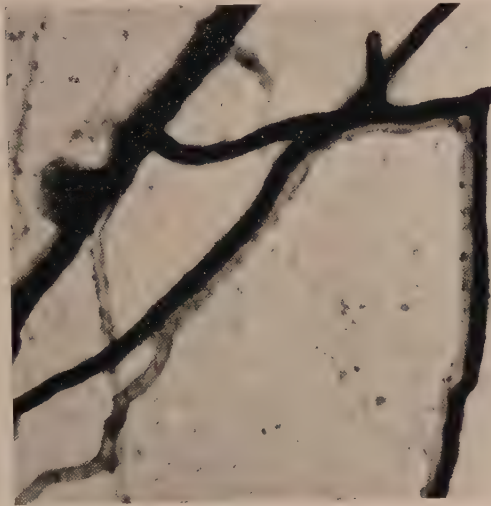


Abb. 8. Septiertes Myzel schmiegt sich dem Verlauf der *Ophiobolus*-Hyphen in natürlichem Boden an. 63 Tage nach Einbringen der Objektträger in den Boden (252 \times).

keine sehr feste. Der Pilz wächst immer wieder aus dem Bereich der *Ophiobolus*-Hyphen heraus. Aber wie eine Betrachtung mit geringerer Vergrößerung zeigt, ist eine kräftige Entwicklung des *Phycomyceten*-Myzels nur in der näheren Umgebung des *Ophiobolus* möglich.

Es sind aber nicht nur *Phycomyceten*, die als Begleiter von *Ophiobolus graminis* auftreten. In der Abb. 8 erkennt man deutlich, wie ein septiertes Myzel sich der Wuchsform von *Ophiobolus graminis* vollkommen angepaßt hat, so daß die gesamten, von *Ophiobolus* durchgeführten kleineren und größeren Änderungen in der Hyphenrichtung von dem Begleitpilz auf fast pedantische Art mitgemacht werden.

Besonders instruktiv ist die Verzweigung des hellen an *Ophiobolus graminis* heranwachsenden, septierten Myzels in der Abb. 9. Das Myzel verzweigt sich entsprechend der Gabelung des *Ophiobolus* und begleitet jede der 3 Hyphen über weite Strecken hin. Auch die Fruchtform des Begleitpilzes wurde beobachtet. Eine Bestimmung war jedoch leider unmöglich.

In den bisherigen Beispielen beschränkten sich die Begleitpilze anscheinend darauf, eng angeschmiegt an die Hyphenoberfläche den *Ophiobolus*-Myzelien zu folgen. Ein Eindringen

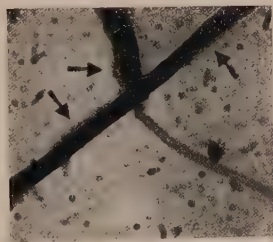


Abb. 9. Septiertes Myzel wächst in natürlichem Boden an eine sich verzweigende *Ophiobolus*-Hyphne und teilt sich entsprechend dem Verlauf des *Ophiobolus*-Myzels in 3 Hyphen, die dann *Ophiobolus* über weite Strecken hin begleiten. Die Pfeile weisen auf die Stellen, an denen das begleitende Myzel neben den *Ophiobolus*-Hyphen hervortritt. 120 Tage nach Einbringen der Objektträger in den Boden (252 \times).

in die Zellen des von ihnen begleiteten Pilzes war nicht zu erkennen, doch war darin angesichts der durch die Undurchsichtigkeit der *Ophiobolus*-Hyphen äußerst erschwerten Beobachtung kein stichhaltiges Argument gegen das Vorhandensein derartiger parasitischer Verhältnisse zu sehen. Es gelang dann in der Tat in einem anderen Falle, das Eindringen einer *Phycomyceten*-Hyphne in *Ophiobolus*-Myzel festzustellen (Abb. 10). Einwandfrei ist zu beobachten, wie der Begleitpilz die Zellwand durchbohrt und ein zweiteiliges Haustorium in die *Ophiobolus*-Zelle entsendet.



Abb. 10. *Phycomycet* entsendet in natürlichem Boden ein T-förmiges Haustorium in eine *Ophiobolus*-Zelle. Die Pfeile weisen auf die Eintrittsstelle und die seitlichen Spitzen des Haustoriums (552 \times).

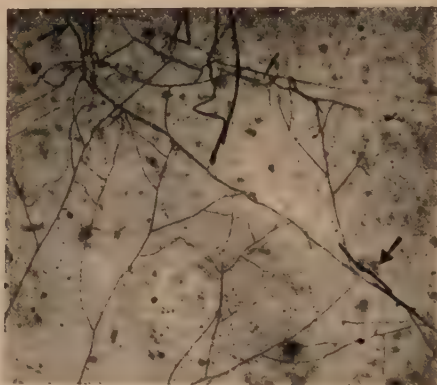


Abb. 11. *Phycomyceten*-Myzel, das in natürlichem Boden an *Ophiobolus*-Myzel herangewachsen ist und es vollkommen zersetzt hat. Die Pfeile zeigen auf Reste bzw. den Beginn des unversehrten *Ophiobolus*-Myzels. 63 Tage nach Einbringen der Objektträger in den Boden. (144 \times).

Solche Beobachtungen müssen angesichts der dunklen Färbung und Undurchsichtigkeit der *Ophiobolus*-Hyphen selten bleiben. Auf anderen Wegen läßt sich jedoch ermitteln, daß das Eindringen in die Hyphen sehr häufig eingetreten sein muß. In der Abb. 11 erkennen wir nämlich, wie das gesamte Myzel eines *Phycomyceten*, und zwar ist es derselbe Pilz wie in der Abb. 5, an eine scharfe, helle Grenzlinie herangewachsen ist, die er nur an 2 Stellen überschreitet, um sofort wieder an eine gleichartige Grenze zu stoßen. Rechts im Bild geht diese Grenze in dunkleres Pilzmyzel über, das einwandfrei aus *Ophiobolus graminis*-Hyphen besteht. In den Verlauf der hellen Grenzzone sind dunkel gefärbte Reste von *Ophiobolus*-Myzel eingestreut. Nach rechts hin ist (auf dem Bild nicht zu sehen) gleichfalls der Anschluß an *Ophiobolus*-Hyphen sichergestellt. Es hat hier also offensichtlich *Ophiobolus*-Myzel gelegen, das von dem *Phycomyceten* begleitet wurde. Früher oder später drang dann der Pilz in die *Ophiobolus*-Hyphen ein, das Myzel wurde vollständig zersetzt, und an seine Stelle trat schließlich nur das Geflecht des früheren Begleitpilzes.

Recht eindringlich zeigt die Abb. 12 das gleiche Geschehen für einen anderen *Phycomyceten*. *Ophiobolus*-Myzel, das sich links im Bilde gabelte, ist von den Hyphen eines Begleitpilzes umspinnen und später durchdrungen worden. Schließlich sind die *Ophiobolus*-Hyphen völlig zerfallen und aufgelöst. An ihrer Stelle sind nun nur noch die *Phycomyceten*-Myzelien vorhanden. Sowohl nach links, wie für beide Stränge der Hyphengabelung nach rechts, läßt sich der Anschluß an unversehrte *Ophiobolus*-Hyphen herstellen, so daß das *Phycomycetengeflecht* als das fehlende Zwischenglied eines früher einheitlichen *Ophiobolus*-Myzels erscheint.

Sowohl in der Abb. 11 wie in der Abb. 12 ist nach beiden Seiten der Anschluß an allem Anschein nach

noch lebendes Myzel vorhanden. Man kann sich daher nicht dem Eindruck entziehen, daß durch den Angriff des Pilzes die von ihm berührten *Ophiobolus*-Myzelien abgetötet, die Hyphen früher oder später auch von dem Begleitpilz durchsetzt und schließlich resorbiert wurden.

Beiderseits der *Ophiobolus*-Hyphen liegende Zellen eines Begleitpilzes zeigt die Abb. 13. Auffallend ist hier, wie stark die Entwicklung des Begleitpilzes in der Nähe der *Ophiobolus*-Hyphen gefördert ist.

Schließlich sei noch auf eine eigenartige, besonders auffallende Form begleitender *Phycomyceten* hingewiesen. Ohne Berührung mit *Ophiobolus*-Myzel zeigt dieser Pilz in der Regel einen normalen Habitus mit regelmäßiger Verzweigung und Hyphendicke. Nur sehr selten wachsen einzelne Seitenhyphen zu Bildungen eigenartiger Struktur aus,

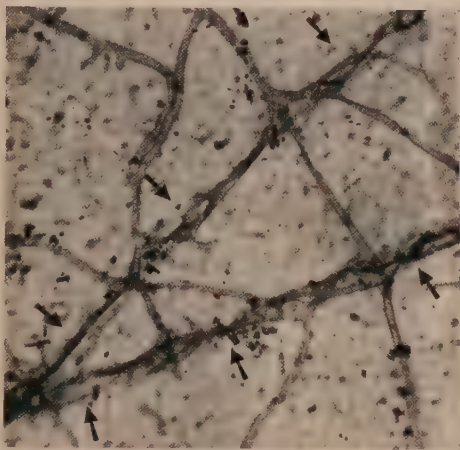


Abb. 12. *Ophiobolus*-Myzel ist in natürlichem Boden durch parasitierende Hyphen eines Begleitpilzes zerlegt. An Stelle der sich links im Bild gabelnden *Ophiobolus*-Hyphen liegt nunmehr ein Geflecht von *Phycomyceten*-Myzel, das das *Ophiobolus*-Myzel vollkommen umspinnen und durchdrungen hat. Die Pfeile kennzeichnen die frühere Lage der *Ophiobolus*-Hyphen (252 \times).

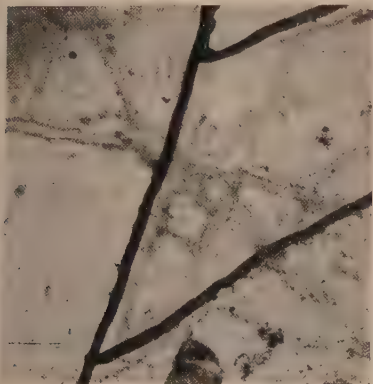


Abb. 13. Myzel eines Begleitpilzes liegt beiderseits von *Ophiobolus*-Hyphen. Eine besonders kräftige Entwicklung des Myzels in der Nähe der *Ophiobolus*-Hyphen ist feststellbar (264 \times).

wie die Abb. 14 sie erkennen läßt. Die Hyphen verbreitern und verschmälern sich ohne jede Regelmäßigkeit, verzweigen sich in mannigfaltigster Form, und zahlreiche Anastomosen werden gebildet, so daß stellenweise nur kleine runde Flecken in der zusammengewachsenen Myzelmasse ausgespart bleiben, die zunächst leicht als Vakuolen angesprochen werden. Der Eindruck ist ein ähnlicher, wie er durch das Aus-

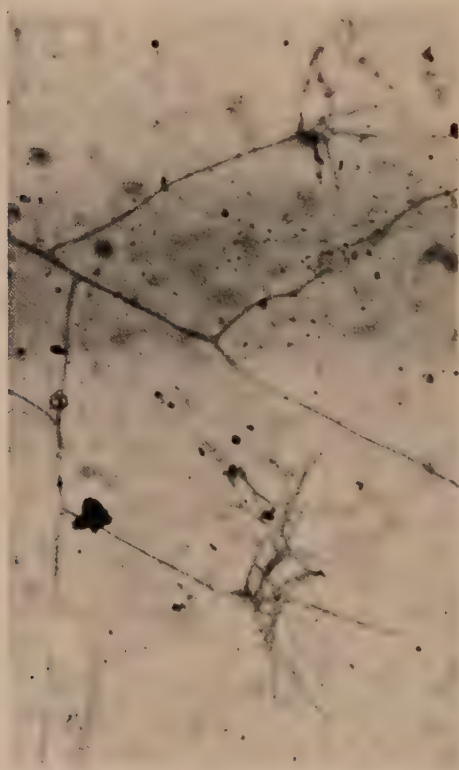


Abb. 14. Myzel eines Begleitpilzes (*Phycomyces*), dessen Seitenzweige z. T. zur Ausbildung „amöboider Myzelien“ übergegangen sind. 120 Tage nach Einbringen der Objektträger in den Boden (490 \times).

treiben sämtlicher Achselknospen bei Tomaten oder Pfirsichen nach Infektion durch das big-bud- bzw. das peach-rosette-Virus entsteht. Der Habitus erinnert dabei in überraschender Weise an eine Amöbe mit ihren Pseudopodien. Um Zerfallsprodukte oder Artefakte handelt es sich dabei in keinem Fall. Man sieht (Abb. 14), wie diese Myzelteile unmittelbar aus den jüngsten wachsenden Hyphen entstehen und scharfe und durchaus normale, mit dem übrigen Myzel übereinstimmende Konturen zeigen.

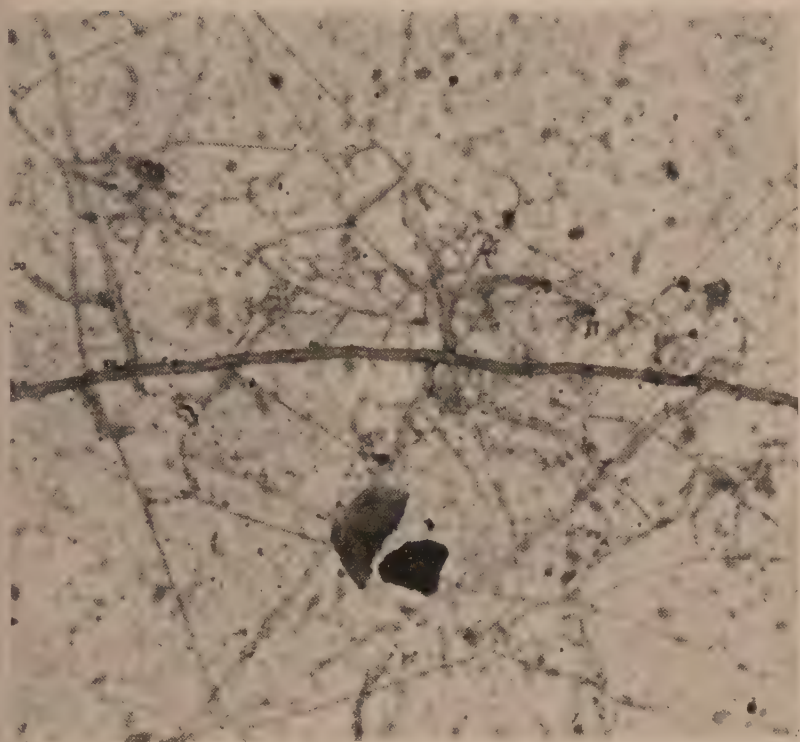


Abb. 15. *Ophiobolus*-Myzel (breit mit Querwänden) mit dem Myzel eines begleitenden *Phycomyceten*, das sich in *Ophiobolus*-Nähe verdichtet und stellenweise „amöboide“ Struktur annimmt. 120 Tage nach Einbringen der Objektträger in den Boden (490 \times).

Gerät nun dieser Pilz in die Nähe von *Ophiobolus*-Hyphen, so begleitet er das Myzel zunächst nach der in Abb. 5 gezeigten Art. Sehr bald beginnt aber in der Nähe des *Ophiobolus*-Myzels eine reichliche Ausbildung solcher „amöboider“ Gebilde unter gleichzeitiger Entwicklung eines sehr dichten Hyphennetzes (Abb. 15). Dabei können auch Hyphenknäule entstehen, die einen durchaus plektenchymatischen oder sklerotialen Charakter zeigen (Abb. 16). Eine extreme Form der Umspinnung einer *Ophiobolus*-Hyphe durch sehr stark „amöboide“ Myzelien zeigt die Abb. 17.

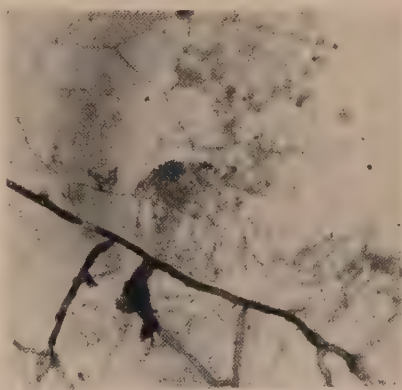


Abb. 16. Verdichtung des Myzels eines begleitenden *Phycomyceten* in Nähe von *Ophiobolus*-Hyphen zu sklerotialen Lagern. 120 Tage nach Einbringen der Objektträger in den Boden (144 \times).

Die extreme Formlabilität des Pilzes zeigt sich besonders darin, daß die Hyphen — wenn auch selten — in der Nähe von *Ophiobolus*-Myzel zarte Seitenhyphen abzweigen können, die sich weiterhin verzweigen und die *Ophiobolus*-Zellen mit einem spinnwebartigen Geflecht rhizoidartigen Charakters überziehen. Die Förderung dieses Pilzes durch die Nähe der *Ophiobolus*-Hyphen ist offensichtlich. Ebenso zeigt sich recht deutlich, daß die Nähe der *Ophiobolus*-Hyphen eine reichliche Bildung der sonst so seltenen „amöboiden“ Myzelteile auslöst. Dagegen wurde nie beobachtet, daß es zu einem Eindringen des Pilzes in die *Ophiobolus*-Hyphen kommt.

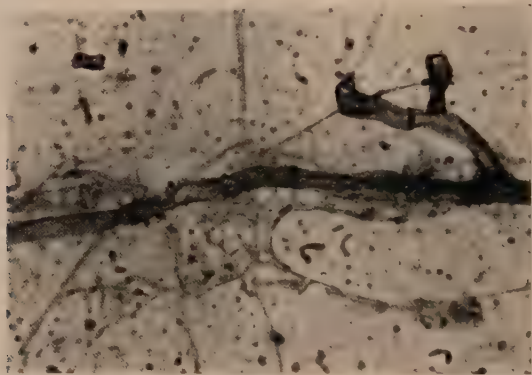


Abb. 17. *Ophiobolus*-Hyphe wird von dem „amöboiden“ Myzel eines begleitenden *Phycomyces* ganz umspinnen. 120 Tage nach Einbringen der Objektträger in den Boden (252 \times).

In den bisherigen Beispielen paßte *Ophiobolus graminis* seine Wuchsform den Partnern niemals an. Irgendein Anreiz, der die sonst einseitige Anpassung zu einer gegenseitigen gemacht hätte, bestand somit für *Ophiobolus graminis* nicht. Ebensowenig konnte in irgendeinem Falle eine Entwicklungssteigerung von *Ophiobolus graminis* durch das Zusammenleben mit dem Begleitpilz beobachtet werden.

Welcher von zwei Partnern als der Begleitpilz des anderen aufzufassen ist, entscheidet die Veränderung der natürlichen Wuchsform. Der Begleitpilz hat sich dem Leitpilz anzupassen. Im Falle gegenseitiger Beeinflussung der Wuchsform müßte somit jeder der beiden Pilze sowohl Begleitpilz wie begleiteter Pilz sein. Welche Funktion er gerade erfüllt, das hängt von der Art der zusammentreffenden Hyphen, insbesondere ihrer Wachsfähigkeit ab. Es muß sich dann der jüngere, wachstumsfähige Pilz dem älteren, ausgewachsenen in seiner Wuchsform anpassen. Der Grund dafür, daß in den bisherigen Beispielen solche wechselseitige Beeinflussung nicht beobachtet wurde, ist aber keineswegs darin zu suchen, daß den sich langsam auf der Platte ansiedelnden Begleitorganismen keine andere Möglichkeit blieb, als sich dem vorhandenen *Ophiobolus*-Myzel anzupassen. Auch *Ophiobolus graminis*

entwickelt sich im natürlichen Boden sehr langsam, die Wahrscheinlichkeit, daß wachstumsfähige *Ophiobolus*-Hyphen auf ausgewachsenes Myzel von *Bodenpilzen* stoßen, ist daher nicht geringer als die umgekehrte Chance. So ist öfter zu beobachten, daß junge Myzelien von *Ophiobolus* sich mit wachsenden Hyphen eines anderen Pilzes treffen und überwachsen, ohne daß sie gegenseitig einen erkennbaren Einfluß auf Wuchsform und Wuchsstärke haben. Der Grund für die einseitige Anpassung kann vielmehr nur darin zu suchen sein, daß eben für *Ophiobolus* ein gleichsinniger Reiz nicht oder nur sehr selten existiert, oder aber die Entwicklung von *Ophiobolus graminis* überhaupt erst die Voraussetzung für die Existenz der Begleitorganismen ist. Beide Möglichkeiten scheinen verwirklicht zu sein. So darf man wahrscheinlich für die Begleitorganismen der Abb. 14 bis 17 in Anspruch nehmen, daß eine kräftigere Entwicklung dieser Pilze weitgehend die Existenz von



Abb. 18. Normal entwickeltes Myzel von *Ophiobolus graminis* auf *Cholodny*-Platten auf natürlichem Boden (144 \times).

Ophiobolus graminis zur Voraussetzung hat. Andererseits läßt sich in vielen Fällen feststellen, daß beim Zusammentreffen wachsender oder voll entwickelter *Ophiobolus*-Hyphen mit sich ausbreitendem Myzel von anderen *Bodenpilzen* nur die letzteren ihre Wuchsform ändern.

Im weiteren Verlauf der Untersuchung wurde dann aber ganz vereinzelt beobachtet, daß *Ophiobolus graminis* seine Wuchsform, wie wir sie in der Art der dunklen Laufhyphen in Abb. 18 vor uns sehen, bei

Annäherung an einen anderen Pilz abändert. Es handelt sich bei ihm also offensichtlich um einen Organismus, der seinen Charakter als Leitpilz selten aufgibt und die Nähe fremder Pilze, wenn auch nicht meidet, so doch nicht oder nur selten sucht. Diese Feststellung gewinnt an Gewicht, wenn berücksichtigt wird, daß *Ophiobolus graminis* bei seiner sich über viele Wochen hinziehenden, sich dabei über eine große Strecke ausdehnenden und erst relativ spät einsetzenden Entwicklung über zahlreiche Pilze hinwegwachsen mußte, die sich vor ihm auf der CHOLODNY-Platte angesiedelt hatten. Gleichwohl nahm er bis auf diese Ausnahmen niemals den Charakter eines Begleitpilzes an. Auf den beiden Abb. 19 und 20 sind die *Ophiobolus*-Hyphen deutlich durch ihre dunklere Farbe erkennbar. *Ophiobolus graminis* kommt in Abb. 19 von rechts unten ins Blickfeld hineingewachsen (Pfeil 1), stößt mit dem helleren Pilz zu-

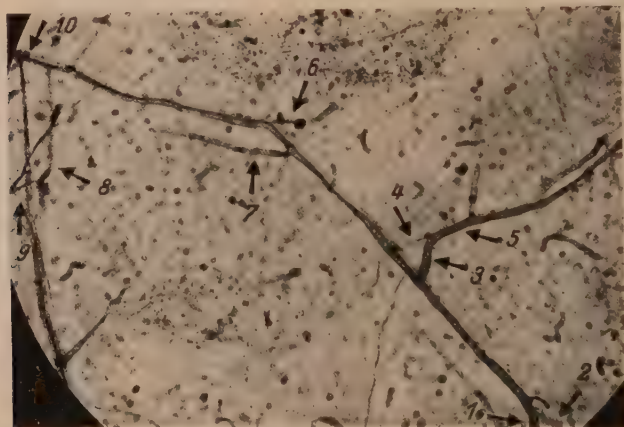


Abb. 19. *Ophiobolus*-Myzel paßt sich der Wuchsform eines anderen Pilzes an. Die mit ungeraden Nummern bezeichneten Pfeile liegen auf der Seite des *Ophiobolus*-Myzels, die mit geraden Nummern bezeichneten Pfeile auf der Seite des von *Ophiobolus* begleiteten Pilzes (264 \times).

sammen (Pfeil 2) und biegt dem Wachstum dieser Hyphe folgend nach links ab. Eine kurz darauf nach rechts abgezweigte *Ophiobolus*-Hyphe (Pfeil 3) stößt sofort wieder auf eine Seitenhyphe des anderen Pilzes (Pfeil 4) und knickt entsprechend ihrem Verlauf nach rechts ab (Pfeil 5). An der Biegung des nun parallel verlaufenden Hyphenverlaufes frukifiziert der begleitete Pilz (Pfeil 6). *Ophiobolus graminis* hat kurz vorher einen normal abgewinkelten Seitenast abgezweigt (Pfeil 7), der aber bald durch die unvorhergesehene Biegung der Haupthyphye zu ihr parallel läuft. Ganz links kommt von unten eine andere *Ophiobolus*-Hyphe hoch (Pfeil 9), die gleichfalls eine helle Hyphe (Pfeil 8) begleitet und beim Zusammentreffen mit der von links kommenden *Ophiobolus*-Hyphe und dem begleiteten Pilz scharf nach links (Pfeil 10) abknickt (Abb. 20 erweitert das Gesichtsfeld nach links). Parallel von unten tritt eine weitere *Ophiobolus*-Hyphe in das Blickfeld (Pfeil 11). Sie entsendet bei

Berühren der vorgenannten begleiteten Hyphe (Pfeil 12) scharf nach rechts einen Seitenast im Winkel von 120° . Eine weitere *Ophiobolus*-Hyphe (Pfeil 13) kommt von links, biegt mit ihrem Hauptast bei Berühren des helleren Myzels (Pfeil 14) unvermittelt nach links mit etwa 80° und schmiegt sich der fremden Hyphe an. Vorher entsendet die

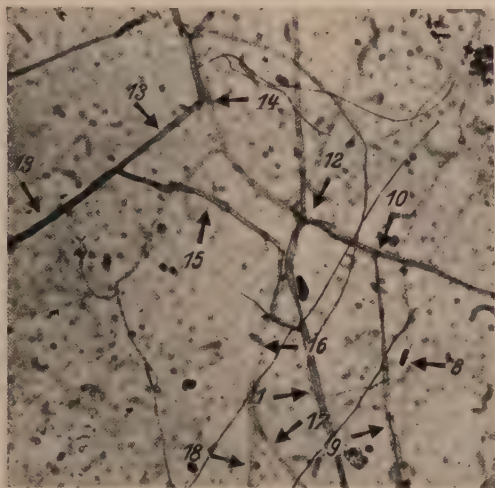


Abb. 20 ergänzt Abb. 19 nach links. Beschriftung wie in Abb. 19. Pfeile mit gleichen Nummern wie in Abb. 19 bezeichnen identische Punkte, die auf beiden sich überschneidenden Gesichtsfeldern vorhanden sind ($264\times$).

Ophiobolus-Haupthyphe einen Seitenast (Pfeil 15), der bei Berühren einer Seitenhyphe (Pfeil 16) des helleren Pilzes nach rechts abgelenkt wird. Eine weitere Anpassung von *Ophiobolus graminis* an seinen Partner erkennt man bei den Pfeilen 17 und 18.

Im benachbarten Abschnitt dieses Objektträgers liegen die Verhältnisse umgekehrt. Hier (Abb. 21) paßt sich der gleiche hellere Pilz dem völlig unbeeinflussten Verlauf der *Ophiobolus*-Hyphen eng an. Nunmehr ist also der begleitete Pilz zum Begleitpilz geworden und umgekehrt. Die Ursache für das entgegengesetzte Verhalten beider Pilze in den benachbarten Zonen liegt in Folgendem. Beide Myzelien haben ein erhebliches Areal überwachsen und ihre Wuchsrichtungen überschneiden sich. Daher gibt es Gebiete, in denen die jungen *Ophiobolus*-Hyphen mit ausgewachsenen helleren Myzelien zusammenstoßen. Dort wird *Ophiobolus* zum Begleitpilz und der Bodenpilz zum begleiteten Pilz. Umgekehrt in der Zone, wo junge Hyphen des Bodenpilzes auf älteres *Ophiobolus*-Myzel stoßen: Hier paßt sich der hellere Pilz dem Verlauf der *Ophiobolus*-Hyphen an.

Nun ist nach SCHAEDE (1942) die Symbiose als das „Miteinanderleben ungleichartiger Organismen“ aufzufassen (DE BARY). Als Grundlage dieser gegenseitigen Beziehungen ist nach seiner Auffassung der

Parasitismus anzusehen, da jede Pflanze naturgedrungen für sich selber sorgen muß, wobei unter Parasitismus wiederum ein einseitiges Schmarotzen verstanden wird. Danach wären also die erstgenannten Fälle einseitiger Begleitung als, wenn auch z. T. einfachste Form oder Vorstufe des Parasitismus aufzufassen. Dabei handelt es sich in einigen Fällen

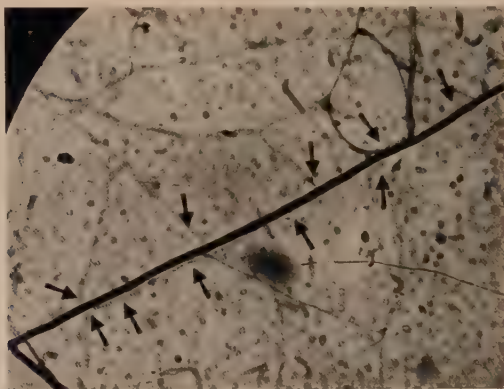


Abb. 21. Der gleiche Pilz, dem sich in den Abb. 19 und 20 *Ophiobolus graminis* in der Wuchsform anpaßt, folgt hier dem *Ophiobolus*-Myzel. Die Pfeile weisen auf die Stellen, an denen der Bodenpilz an *Ophiobolus* herantritt bzw. ihn begleitet (264 \times).

offensichtlich um intoleranten Parasitismus (Abb. 3, 4, 10, 11, 12). Andere Kombinationen sind dagegen wahrscheinlich (es fehlt zur definitiven Entscheidung der exakten Versuch) als toleranter Parasitismus (SCHAEDE 1942) aufzufassen, da der eine Partner (*Ophiobolus*) keinen sichtlichen Schaden erleidet (Abb. 7, 8, 9, 14—17), der „Parasit“ jedoch mehr (13, 14—17) oder minder deutlich (Abb. 5, 6, 9) oder gar nicht (7, 8) gefördert wird. Natürlich erhebt sich die Frage, wie diese Förderung des Begleitpilzes zu erklären ist. Es kommt hier insbesondere eine Ausscheidung von Säuren oder anderen Abbauprodukten, wie sie im Stoffwechsel normalerweise gebildet werden, Vitaminen oder wichtigen Vitaminbestandteilen in Frage. Es könnten aber auch durch Veränderung der Permeabilität der Hyphenwände durch den begleitenden bzw. begleiteten Organismus Vorgänge eine Rolle spielen, wie sie BURGEFF (1938) für die Mykorrhizen der Prothallien der *Lycopodiales* festgestellt und unter dem Begriff der Chylophagie zusammengefaßt hat. Insbesondere liegt eine solche Auffassung bei der dichten Umspinnung von *Ophiobolus graminis* durch den Begleitpilz in den Abbildungen 14—17 und der offensichtlich starken Entwicklungsförderung des Begleitpilzes nahe. Er umfließt gleichsam die *Ophiobolus*-Hyphen mit seinen „amöboiden Zellkonglomeraten“ oder umspinnt sie mit feinsten rhizoidartigen Myzelfäden, die sich schließlich so fein verzweigen, daß ihre Breite bis dicht an die Grenze des Auflösungsvermögens des Lichtmikroskops her-

anreicht, und sucht so, auf jede Weise den Kontakt mit den *Ophiobolus*-Hyphen zu verstärken, ohne daß jemals ein Eindringen in die Hyphen zu erkennen ist.

Es drängt sich selbstverständlich die Frage auf, ob nicht ein Teil der hier geschilderten Erscheinungen unter dem Begriff der Parabiose, d. h. eines Nebeneinanderlebens, wie wir es in Pflanzengesellschaften kennen, einzureihen ist. Zwar ist das Zusammenleben der beiden Partner zeitweise eng und ein gegenseitiger Einfluß z. T. deutlich erkennbar. Beide Kontrahenten verlieren aber zumeist wiederholt und offensichtlich leicht den engen Kontakt, ohne ihre Existenzfähigkeit einzubüßen oder gar ohne in ihrer Entwicklung geschwächt zu sein. Nach SCHAEDE sind für die Symbiose, das „Miteinander“ zweier Organismen, engste körperliche Beziehungen charakteristisch, ohne daß es allerdings zu einem Leben im Körper oder der Zelle des anderen Organismus gekommen sein muß. Allerdings berichten TOBLER (1934), GEITLER (1937) und THOMAS (1939), daß auch *Pilze*, die Komponenten von *Flechten* sind, diese Lebensgemeinschaft in künstlicher Kultur oder auch in der Natur freiwillig verlassen können. Doch ist in der Regel die Bindung in einer echten Symbiose wesentlich enger als in den hier untersuchten Fällen des Zusammenlebens zweier Organismen. Man muß daher wohl der Auffassung zustimmen, daß es sich hier zumeist um Erscheinungen handelt, die als „unvollkommen gelingende Symbiosen“ (TOBLER, 1934) zwischen der Parabiose und der Symbiose einzureihen sind, also um eine Parallele zu der Verpilzung aerophiler *Luftalgen* wie SCHMIDT (1933) und THOMAS (1939) sie beschrieben und untersucht haben.

Mit dieser Einschränkung kann man nach der Nomenklatur von SCHAEDE das wechselseitige Aufsuchen der beiden Partner (Abb. 19—21) unter dem Begriff des Alleloparasitismus einreihen, der die Vorstellung einer gegenseitigen Ausnützung in sich trägt. Dabei muß es sich nach SCHAEDE (1942) von beiden Seiten um toleranten Parasitismus handeln, so daß der Alleloparasitismus als Eusymbiose aufgefaßt werden kann. Eine Schädigung der beiden Partner ist auch keinesfalls feststellbar. Schwieriger würde es dagegen sein, diese wechselweise Begleitung wegen des damit gekoppelten Begriffs der gegenseitigen Förderung als Mutualismus zu bezeichnen.

Es ist nicht unmöglich, daß es sich auch in anderen Fällen (Abb. 7, 8, 9, 13) um einen solchen Alleloparasitismus handelt, daß also jeder Partner den anderen aktiv aufsuchen und ausnutzen kann. Hier ist nämlich die Myzelausbildung der begleitenden Pilze relativ schwach, so daß sie — vielleicht auch etwas später sich entwickelnd — nur mit ausgebildeten *Ophiobolus*-Hyphen zusammentrafen. Für andere Pilze (Abb. 5, 11, 12, 14—17) scheidet jedoch die Möglichkeit einer solchen wechselseitigen Anpassung aus, da das begleitende Myzel mehr oder weniger stark über die ganze Platte hin entwickelt ist, und zudem häufig, wie die Abtötung der *Ophiobolus*-Zellen zeigt, ein symbiotisches Gleichgewicht fehlt. Das junge *Ophiobolus*-Myzel wächst hier in das Netz älterer Begleithyphen hinein, ohne daß eine Beeinflussung seiner Wuchsform festzustellen ist.

Von der eingangs aufgenommenen Fragestellung ausgehend bleibt zu entscheiden, ob diese Vorgänge, insbesondere also die Begleitung oder Parasitierung der Hyphen durch *Actinomyceten* und *Pilze* die stark hemmende Wirkung natürlicher Böden erklären könnten. Die später einsetzende Entwicklungshemmung im partiell sterilisierten Boden ließ sich z. T. auf die auf den *Ophiobolus*-Hyphen wuchernden *Actinomyceten* zurückführen. Für die natürlichen Böden müssen wir diese Frage jedoch verneinen. Einmal handelt es sich bei einem erheblichen Teil der beobachteten Fälle von lockerem Zusammenleben um einfachste Formen des toleranten Parasitismus. Zudem war auch nach 18 wöchentlichem Verbleiben von *Ophiobolus graminis* in natürlichen Böden stets nur ein relativ geringer Prozentsatz von begleitenden *Pilzen* oder *Actinomyceten* festzustellen. Andererseits muß aber darauf hingewiesen werden, daß die Entwicklungsbedingungen für *Ophiobolus graminis* durch den leicht verfügbaren Nährstoffvorrat der Agarplättchen ungewöhnlich günstig waren. Unter natürlichen Verhältnissen ist der Pilz dagegen auf die schwer zugänglichen Reserven im Boden angewiesen und wird insbesondere auf der Stoppel erheblich unter N-Mangel zu leiden haben. Die Entwicklung ist dementsprechend viel schwächer. Nach den Beobachtungen von GARRETT (1938) muß sogar mit einer fast völligen Einstellung des Wachstums gerechnet werden. Der Zugriff von Begleitpilzen bzw. Parasiten muß sich unter diesen Bedingungen viel deutlicher bemerkbar machen. Stellt man die Gesamtzahl der begleitenden, bzw. dem Myzel aufsitzenden *Bakterien*, *Actinomyceten* und *Pilze* in Rechnung und vergleicht die Dichte der Mikrobenentwicklung in der Hyphosphäre mit ihrer Häufigkeit im freien Boden, so kommt man zu der Feststellung, daß die Anhäufung von Mikroben in Hyphennähe eine erhebliche unmittelbare antibiotische Wirkung wahrscheinlich macht.

Ohne Zweifel werden also Stoffwechselprodukte antibiotischer oder harmloser Natur von *Bakterien*, *Actinomyceten* und *Pilzen* sehr häufig in unmittelbarer Umgebung der Hyphen ausgeschieden, die so in höchster Konzentration wirken können. Keinesfalls darf aber hier, ebensowenig wie bei der *Actinomyceten*-Überentwicklung, die Bedeutung dieser unmittelbaren antibiotischen Wirkung oder Parasitierung für die Entwicklung von *Ophiobolus graminis* neben der mittelbaren Hemmung durch die in der Bodenlösung diffus verteilten antibiotisch wirksamen Stoffe überschätzt werden. Wie weit solche gelösten Stoffe von Bedeutung sind, suchte WINTER (1942) durch Untersuchung der Hemmungswirkung wässriger, entkeimter und hinreichend konzentrierter Bodenextrakte zu entscheiden. Er beobachtete zwar in solchen Bodenauszügen eine durch Erhitzung zu beseitigende deutliche Hemmung des Laufhyphenwachstums. Doch bestand hier die Gefahr, daß die Toxine bei der durch langsame Verdampfung erfolgenden Konzentrierung der Extrakte z. T. durch Oxydation zerstört wurden. Besser schien es daher, das „Negativ“ dieses Versuches durchzuführen, also den mit Wasser einmal oder wiederholt ausgeschüttelten Boden auf seine Hemmungswirkung zu untersuchen. Ließen sich die Hemmungs-

stoffe nämlich in erheblicher Menge auswaschen, so mußte der ausgeschüttelte Boden *Ophiobolus graminis* günstigere Entwicklungsbedingungen bieten. Dementsprechend wurde nunmehr eine Petrischale mit lufttrockener Gartenerde mit 500 cm³ Leitungswasser 20 Minuten ausgeschüttelt. Nach dem Absetzen wurde dekantiert, die Erde auf Filterpapier sehr rasch an der Luft bei Zimmertemperatur getrocknet und erneut bis zu 40% der maximalen Wasserkapazität angefeuchtet. Das Wachstum der saprophytischen Myzelien stieg nach dieser Behandlung von 2,3 mm in unbehandeltem Boden auf 7,0 mm (auf CHOLODNY-Objektträger, 14tägige Versuchsdauer). In entsprechend behandelter Komposterde stieg nach einmaligem Auswaschen das Wachstum von 1,0 mm in der unbehandelten Kontrolle auf 5,6 mm und nach Wiederholung der Extraktion auf 9,3 mm. Durch Entfernung der toxinreichen Bodenlösung wird also die Hemmungswirkung des natürlichen Bodens weitgehend beseitigt. Diese Tatsache könnte auch im Freiland Bedeutung haben, da starke Regenfälle zu einer derartigen Auswaschung der Hemmungsstoffe — wenn auch in schwächerem Ausmaß — führen könnten.

Alle bisher genannten Formen des Zusammenlebens mit verschiedenen Mikroben werden also zumeist einen ungünstigen Einfluß auf die Entwicklung von *Ophiobolus graminis* haben, oder sind zumindest für ihn ohne Bedeutung. Nur für die gegenseitige Beeinflussung (Abb. 19—21) war an sich eine günstige Entwicklung zu erwarten. Ein besserer Wuchs war aber nicht feststellbar. Es wäre trotzdem eine Entwicklungsförderung denkbar, wenn sich das Gleichgewicht zwischen *Ophiobolus* und *Bodenpilz* über die „Symbiose“ hinaus ganz zu Ungunsten der *Bodenpilze* verschiebt, d. h. *Ophiobolus graminis* einseitig zum Begleitpilz oder gar zum Parasiten wird.

Dabei muß unterschieden werden zwischen der Begleitung oder Parasitierung niederer Organismen, insbesondere also von *Pilzen*, und einer Besiedlung oder Parasitierung höherer Pflanzen, wie wir sie in der Schwarzbeinigkeit des *Weizens* kennen.

Eine solche Parasitierung von *Pilzen* durch *Ophiobolus graminis* scheint nun tatsächlich zu existieren. In einem Versuch wurde das Wachstum von *Ophiobolus graminis* auf CHOLODNY-Platten nach Zugabe von 3% Biomalz (berechnet auf das Bodenwasser) geprüft. Es wurde beobachtet, wie *Ophiobolus graminis* sich dem Myzel eines anderen *Pilzes*, der eine große Fläche des Objektträgers überwachsen hatte, anpaßte, es über lange Strecken begleitete, in die Hyphen eindrang und das Myzel teilweise unter Mitwirkung von *Actinomyceten* gänzlich zersetzte (Abb. 22, 23). Die Entwicklungssteigerung von *Ophiobolus graminis* im Bereich dieses *Bodenpilzes* ist dabei ganz eindeutig. Das Myzel ist kräftiger, die Verzweigung gesteigert.

Es bleibt zu entscheiden, ob in diesem Fall *Ophiobolus* totes oder lebendes Myzel angegriffen hat. Nun liegt das Myzel des *Bodenpilzes* z. T. unmittelbar neben dem Agarplättchen. Es ist daher mit den am frühesten entstandenen *Ophiobolus*-Hyphen zusammengestoßen. Wie ferner die Anpassung der *Ophiobolus*-Hyphen an den *Bodenpilz* zeigt,

hat sich das Myzel des Bodenpilzes zuerst auf dem Objektträger angesiedelt. Da nun der Versuch nur wenige Tage dauerte und der Pilz mit den ältesten Teilen der *Ophiobolus*-Hyphen zusammentraf, kann das Myzel des *Bodenpilzes* nur Tage oder Stunden alt gewesen sein, als es mit dem *Ophiobolus*-Myzel in Berührung kam. In allen bisherigen Ver-

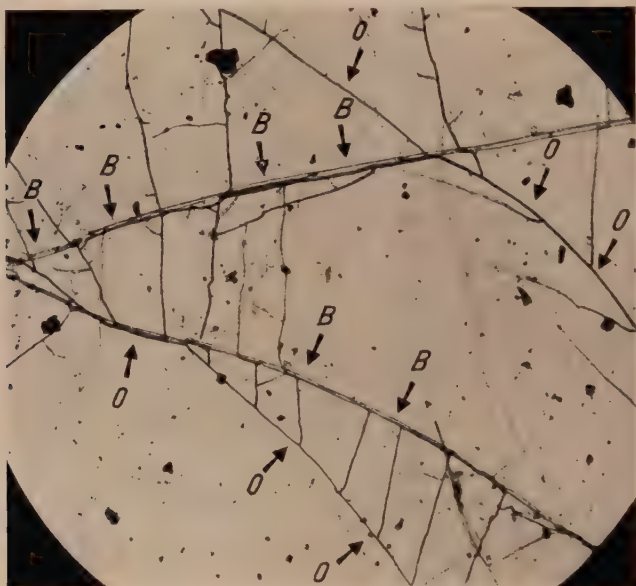


Abb. 22. *Ophiobolus*-Myzel (die dunklen, schmälern Hyphen) begleitet und durchsetzt die Hyphen eines *Bodenpilzes* (heller gefärbt und breiter, links zusammenlaufend). Eine Steigerung der *Ophiobolus*-Entwicklung ist eindeutig festzustellen. Die mit O bezeichneten Pfeile deuten auf das *Ophiobolus*-Myzel, die mit B bezeichneten Pfeile auf die Hyphen des *Bodenpilzes* (60 \times).

suchen ist ferner *Ophiobolus graminis* in zahllosen Fällen über abgestorbenes Myzel hinweggewachsen, ohne in irgend einer Weise beeinflußt zu werden. Wenn also hier ein spezifischer Anreiz vorliegt, — der nicht nur lokal, sondern über den ganzen Objektträger hin zu beobachten war —, so ist eine solche Spezifität kaum für ein totes, viel eher dagegen für ein lebendes Myzel zu erwarten. Das geringe Alter des *Bodenpilzes* wie diese Spezifität sprechen also dafür, daß *Ophiobolus graminis* das lebende Myzel besiedelte, schließlich in es eindrang und vollkommen zersetzte. Doch einerlei, ob es sich um lebendes oder totes Myzel gehandelt hat, die Wirkung dieses Zusammenlebens ist auf jeden Fall für *Ophiobolus graminis* günstig. Erhält *Ophiobolus graminis* Anschluß an diesen *Bodenpilz*, der in diesen Versuchsserien mit Biomalz häufig so dicht den Boden durchzog, daß man makroskopisch einen weißen Flaum erkennen konnte, so kann er explosionsartig mit diesem

Pilz zusammen, sich gleichsam an ihn hängend, viele Zentimeter tief den ganzen Boden durchwuchern.

Das bisher Gesagte zusammenfassend, können wir also feststellen, daß es für das Zusammenleben von *Ophiobolus graminis* mit anderen Mikroben im natürlichen Boden alle Übergänge von der Dyssymbiose



Abb. 23. *Ophiobolus* (die dunklen Hyphen) schmiegt sich dem Bodenpilz an, eine helle *Ophiobolus*-Hyphe ist in die Hyphe des Bodenpilzes eingedrungen und hat sie in der ganzen Länge durchsetzt (270 \times).

(SCHAEDE), in der *Ophiobolus* dem Angriff der übrigen Bodenmikroben erliegt, über die Eusymbiose (SCHAEDE), in der *Ophiobolus* und die anderen Organismen sich einseitig oder gegenseitig aufsuchend, begleitend und in ihrer Wuchsform beeinflussend mit oder ohne einseitige oder gegenseitige Förderung zusammenleben, bis zur umgekehrten Form der Dyssymbiose gibt, in deren Verlauf nun *Ophiobolus* seinen Partner parasitiert und eine auffallende Entwicklungssteigerung erfährt.

Über die Parasitierung von Wurzeln anfälliger Pflanzen durch *Ophiobolus graminis* braucht hier nicht gesprochen werden, ihr günstiger Einfluß auf die Massenentwicklung des Pilzes bedarf keiner Diskussion. Wie nun aber einzelne Pilze *Ophiobolus* parasitieren, andere sich ihm anpassen und in seiner Umgebung besser oder nur gedeihen, so ist es auch denkbar, daß es neben höheren Pflanzen, die *Ophiobolus* parasitiert, auch solche Arten gibt, deren Wurzeln er nur begleitet und aus deren Nährstoffgehalt in der Rhizosphäre er Nutzen zieht. Bereits früher (WINTER 1942) wurde gezeigt, daß die Bildung der Laufhyphen an die Wirtspflanze (Weizen) keine absolute ist. Im reinen Sand ver-

suchen Seitenzweige der Laufhyphen aus der Rhizosphäre in den Boden zu wachsen. Sie werden aber an der Grenze der Rhizosphäre wahrscheinlich durch den chemotropischen Reiz der Wurzelausscheidungen zur Wurzel zurückgelenkt. Das Spiel wiederholt sich, so daß diese Myzelien ohne Infektionshyphen in die Wurzel abzubzweigen, also nur von den Wurzelausscheidungen lebend, in kurvenartigem Wachstum die Wurzel begleiten. Diese ja relativ noch strenge Bindung an die Rhizosphäre hört auf, sowie Ausscheidungen benachbarter Wurzeln in der Nähe sind; dann beginnt ein lebhaftes Hin und Her von *Ophiobolus*-



Abb. 24. Änderung und Stimulierung des Wuchses von *Ophiobolus graminis* in der Rhizosphäre einer nicht anfälligen Pflanze. Die Wurzel lief quer durch die Mitte des Bildes. Die Pfeilspitzen kennzeichnen die obere und untere Grenze der Rhizosphäre. Innerhalb der Rhizosphäre Verdichtung des Wuchses, Parallelisierung zur Rhizosphäre und ständig wechselnder Hyphenverlauf durch Anschmiegen an die Wurzelhaare. Vergl. hierzu den normalen Habitus von *Ophiobolus* Abb. 18. (21 \times).

Hyphen zwischen den beiden Wurzeln. Ebenso wächst der Pilz recht häufig aus der Rhizosphäre heraus, wenn ihr chemotropischer Reiz durch eine 0,1%ige Maismehlzugabe zum Boden kompensiert wird. Umgekehrt ist in natürlichem Boden die Bindung an die Wurzeloberfläche stärker als in reinem Sand. Das bogige Wachstum ist nur in schwachen Andeutungen vorhanden, da die Lebensbedingungen im Boden, also außerhalb des Rhizosphärenbereiches infolge der antagonistischen Mikroben-tätigkeit außerordentlich ungünstig sind. Wird aber natürlicher Boden sterilisiert, so zweigt von den Laufhyphen ein dichtes Myzelgeflecht ab, das zentimetertief in den Boden eindringt.

Alle bisherigen Erfahrungen zeigen, daß die Bedingungen für die saprophytische Entwicklung von *Ophiobolus graminis* in natürlichem

Boden recht ungünstig sind. Es muß infolgedessen die Verseuchung eines Bodens in Abwesenheit anfälliger Pflanzen zurückgehen (vgl. hierzu insbesondere GARRETT [1938]). Infolge der besonderen Bedingungen, die nach den Untersuchungen von STILLE (1938) in der Rhizosphäre herrschen und die Mikrobenentwicklung begünstigen, ist aber damit zu rechnen, daß auch im Bereich der Wurzeln resistenter Pflanzen eine verstärkte Entwicklung von *Ophiobolus graminis* im Vergleich zum unbewachsenen Boden möglich ist. Diese Frage ist von erheblicher praktischer Bedeutung, da möglicherweise resistente Kulturpflanzen oder

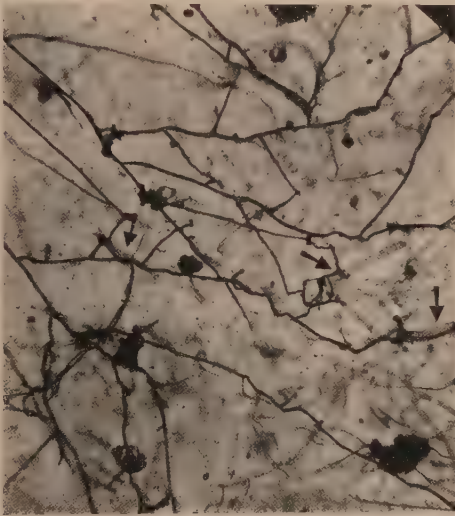


Abb. 25. Ausschnitt aus Abb. 24. Welliger Verlauf der Hyphen. Das Anschmiegen an die großenteils schon zerfallenen oder zerfallenden Wurzelhaare ist stellenweise (Pfeile) zu erkennen. Vgl. hierzu den normalen Habitus von *Ophiobolus* Abb. 18. (134 \times).

Unkräuter als Überträger bzw. Erhalter der Bodenverseuchung dienen könnten. Und zwar besteht dieses Problem infolge der bei allen Pflanzen zu erwartenden Sonderbedingungen der Rhizosphäre nicht nur für *Ophiobolus graminis*, sondern für alle bodenbewohnenden fakultativen Parasiten. Es gilt also, für sie alle nicht nur ihre Lebensweise in natürlichem Boden, sondern vor allem auch ihre Entwicklungsbedingungen in der Rhizosphäre nicht anfälliger Pflanzen klarzustellen.

Bei Untersuchung der mit *Ophiobolus graminis* bewachsenen CHOLODNY-Platten, die mehrere Wochen in natürlichem Boden gelegen hatten, waren die Wurzeln auskeimender, der Artzugehörigkeit nach unbekannter, dikotyler, also gegen *Ophiobolus graminis* resistenter Unkrautsamen über die Platte gewachsen und mit *Ophiobolus*-Myzel zusammengestoßen. Dabei ist eine auffallende Stimulierung der *Ophiobolus*-entwicklung in der Rhizosphäre dieser Wurzeln einge-

treten. Das Myzel ist kräftiger geworden, es verzweigt sich sehr engmaschig (Abb. 24). Sein normaler Habitus (vgl. Abb. 18) ist durch den unregelmäßigen, welligen oder zackigen Verlauf der einzelnen Hyphen und die abnorme Dichte ihrer Verzweigung verändert. Dieser eigenartige Wuchs des Myzels ist dadurch veranlaßt (Abb. 25), daß die Hyphen sich den Wurzelhaaren anschniegen. Von ihnen gehen wahrscheinlich, sei es im lebenden oder zerfallenden Zustand, chemotropische Reize aus und zwingen die *Ophiobolus*-Hyphen, von allen Seiten auf sie einwirkend, entsprechend den dauernd wechselnden Resultanten der wirkenden Kräfte zu fortwährenden Richtungsänderungen. So wie die einzelnen Wurzelhaare die Hyphen beeinflussen, so wirkt die gesamte Rhizosphäre auf den Wuchs des Myzels. Zwar ist kaum eine Beeinflussung der Wuchsrichtung zu sehen, sofern die Hyphen in senkrechter Richtung auf die Rhizosphäre zuwachsen. Verläßt die Leithyphe des Myzels aber die Wurzel senkrecht zu ihrer Wuchsrichtung, so macht sich der Einfluß der Rhizosphärennähe auf die Seitenhyphen deutlich bemerkbar. Sie bilden zunächst z. T. normale Winkel mit der Leithyphe,



Abb. 26. Verstärkte Entwicklung und Habitusstörung bei Durchwachsen einer Wurzelzone mit schon zersetzten Wurzelhaaren. Man erkennt die in Wurzelnähe beginnende Verzweigung des vorher zierlichen, so gut wie unverzweigten Myzels. Doch ist der Hyphenverlauf infolge des Fehlens von Wurzelhaaren glatter. Vgl. hierzu den normalen Habitus von *Ophiobolus* Abb. 18. (60 \times).

zeigen jedoch bald große Unsicherheit in der Wuchsrichtung und biegen häufig nach rückwärts zur Rhizosphäre um. In anderen Fällen ist deutlich zu erkennen, wie der Pilz bestrebt ist, sich der Wurzelrichtung parallel zu legen (Abb. 24, 26). In der Abb. 26 ist gleichfalls eine deutliche Steigerung der Pilzentwicklung feststellbar. Dabei fehlt aber der deformierende Einfluß der Wurzelhaare, da es sich um offensichtlich

ältere Partien mit weitgehend zersetzten Wurzelhaaren handelt. In beiden Fällen war ein Eindringen des Pilzes in die Wurzeln nicht feststellbar, auch fehlte eine wirkliche Bindung an die Rhizosphäre. Der Pilz wurde lediglich stimuliert und durch die Nährstoffausscheidung der Rhizosphäre an der Ausbildung einer normalen Wuchsform gehindert. Dagegen ist in natürlichem Boden, also unter den vorliegenden Bedingungen, eine Lösung der Laufhyphen von der Wurzeloberfläche des Weizens unmöglich. Wir müssen auch daraus den Schluß ziehen, daß es sich nicht um Wurzeln von Wirtspflanzen des Pilzes handelt.

Die von der Wurzel ausgehenden Reize sind also doch nicht hinreichend stark, um zu verhindern, daß einige Hyphen die Rhizosphäre rasch wieder verlassen. Insbesondere stoßen die Leithyphen solcher Myzelien, die mehr oder minder senkrecht zur Längsrichtung der Wurzel wachsen, unverändert durch die Rhizosphäre, da in diesem Fall die Hyphen beiderseitig von gleich starken Reizen getroffen werden. Dagegen werden Myzelien, die schräg an die Rhizosphäre heranwachsen, viel stärker in dem Wurzelbereich festgehalten. Aber auch unter diesen Bedingungen gelingt es einzelnen Seitenhyphen immer wieder, aus der Rhizosphäre herauszuwachsen.

Man kann zu einem Verständnis dieses Verhaltens kommen, wenn man annimmt, daß die tatsächliche Wuchsrichtung des Pilzes von der Resultanten aus der endonom bestimmten Orientierung, bzw. aus der diese Richtung bestimmenden endonomen Kraft, und einer von der Wurzelzone ausgehenden (wahrscheinlich chemotropischen) Richtkraft bestimmt wird. Wächst also eine Hyphe aus der Rhizosphäre heraus, so wird sie bestrebt sein, ihren Zuwachs in Richtung der Resultanten aus endonomer Kraft und dem im allgemeinen senkrecht zu der Wurzel wirkenden tropistischen Einfluß einzustellen. Damit würde aber die endonome Richtkraft schließlich die Lage der Resultanten einnehmen. Mit dieser Richtungsänderung der endonomen Orientierung muß also wiederum die Resultante zwischen beiden Einflüssen eine neue Lage erhalten. Wiederum sucht die Hyphe in die Richtung der Resultante zu wachsen. Es wiederholt sich also das Spiel — in Wirklichkeit natürlich in Form eines integrierbaren Prozesses — und die Hyphe wird bogenförmig zur Wurzel zurückgeführt. Die Umkehr wird umso rascher erzwungen, je stärker der tropistische Reiz ist. Bei schwächeren Reizen ist dagegen die Krümmung der entstehenden Wachstumskurve relativ gering. Der Pilz kann daher unter Umständen die Rhizosphäre verlassen, sofern der schwache Reiz sich nicht ungewöhnlich weit in den Boden erstreckt.

Auf dieser, allerdings vorläufig rein hypothetischen Grundlage lassen sich die oben geschilderten Erscheinungen erklären. Bei starkem Reizgefälle an Weizenwurzeln in reinem Sand werden alle schräg herauswachsenden Hyphen des Pilzes zum bogenförmigen Zurückwachsen zur Wurzeloberfläche gezwungen. Das Spiel wiederholt sich, sobald die Hyphe aus irgendwelchen Ursachen wieder eine aus der Rhizosphäre herausführende Wuchsrichtung einschlägt. Wird das Reizgefälle abge-

schwächt (durch Nähe anderer Wurzeln oder Maismehlzugabe zum Boden), so führen die Bogen weiter in den Boden und ein Teil der Hyphen kommt ganz aus der Rhizosphäre heraus. Ähnlich gelingt es dem Pilz bei dem offensichtlich schwächeren Reizgefälle der wurzel-nahen Zone nichtanfälliger Pflanzen relativ leicht, sich aus der Rhizosphäre zu entfernen: und zwar umso rascher, je mehr seine Wuchsrichtung sich der Senkrechten auf der Längsachse der Wurzel nähert, bis im Grenzfall der in der Längsrichtung der Hyphle liegende tropistische Reiz unwirksam wird.

In natürlicher Komposterde oder Lößlehm ist dagegen die Bindung der Hyphen an die Rhizosphäre von Weizenwurzeln noch stärker als in reinem Sand. Die Laufhyphen liegen der Wurzeloberfläche fast stets an. Nun ist im natürlichen Löß oder natürlicher Komposterde der Antagonismus in solchem Ausmaß begrenzender Faktor, daß es nach eigenen unveröffentlichten Untersuchungen bei keiner Form der Nährstoffzugabe (Biomalz, Pepton, Glykose, Maismehl in verschiedensten Konzentrationen) zu einer wesentlichen Wachstumssteigerung freier saprophytischer Myzelien kommt. Andererseits ist in diesen beiden Bodenarten die Ausbreitungsgeschwindigkeit der parasitischen Laufhyphen, wenn auch gering, so doch nach unseren Untersuchungen (WINTER 1942, 1947) immer noch viel größer als das Wachstum von der Rhizosphäre unabhängiger, durch das Agarscheibchen mit einem erheblichen Nährstoffvorrat versehener, rein saprophytischer Myzelien. Es muß daher die Bildung antibiotischer Stoffe oder ihre Wirkung in der Rhizosphäre abgeschwächt sein, damit der Nährstoffreichtum der Wurzelumgebung eine so starke Wachstumssteigerung auslösen kann. Für eine solche antagonistische Pufferung der Rhizosphäre, die zu einer starken Bindung der Laufhyphen an die Rhizosphäre führen muß, spricht gleichfalls die außerordentliche Entwicklungssteigerung der saprophytischen Myzelien in der Wurzelumgebung der hier untersuchten nicht anfälligen Pflanzen, die sonst durch keine Form der Nährstoffzugabe in diesem Boden zu einer erheblichen Wachstumssteigerung gebracht werden konnten.

Da im allgemeinen (GARRETT 1934; MORITZ 1933) die Intensität des Antagonismus gegenüber *Ophiobolus* und die mikrobielle Aktivität einander entsprechen, wäre in der Rhizosphäre eine starke Abnahme der Bakterienzahlen zu erwarten. Die Rhizosphäre zeichnet sich aber auch hier durch besonderen Mikrobenreichtum aus. Danach müssen zwischen der Mikroflora der Rhizosphäre und des freien Bodens erhebliche qualitative Unterschiede bestehen.

Zusammenfassung.

1. Ein wenige Wochen nach der partiellen Sterilisation einsetzender, im natürlichen Boden nicht beobachteter Zerfall des *Ophiobolus*-Myzels ist auf eine Überentwicklung von *Actinomyceten* zurückzuführen, die teils den Hyphen aufsitzend, teils frei im Boden wachsend eine Zerstörung des *Ophiobolus*-Myzels hervorrufen.

2. Im natürlichen Boden wird ein regelmäßiger Bewuchs der *Ophiobolus*-Hyphen mit Bakterien, *Actinomyceten* und Pilzen festgestellt. Ins-

besondere bevorzugen viele Pilze die Nähe der *Ophiobolus*-Hyphen und passen sich ihnen in ihrer Wuchsform mehr oder minder eng an.

Es werden dabei alle Übergänge von der Parabiose bis zum toleranten und intoleranten Parasitismus mit nachfolgender Zerstörung und restloser Auflösung des *Ophiobolus*-Myzels beobachtet. Es kommt aber auch zur Entwicklung der einfachsten Form eines Alleloparasitismus in Form gegenseitiger Anpassung der Wuchsform beider Partner. Eine gegenseitige Förderung ist dabei infolge des Fehlens experimenteller Untersuchungen nicht feststellbar.

Einige Begleitpilze entwickeln sich offensichtlich nur oder vorwiegend in der Gegenwart oder der Nähe von *Ophiobolus graminis*. Sie erfahren durch ihn eine Entwicklungsförderung.

Die Parasitierung und die durch unmittelbar den Hyphen aufsitzenende Mikroben verursachte antibiotische Wirkung müssen für die Erklärung der Entwicklungshemmung von *Ophiobolus graminis* im natürlichen Boden berücksichtigt werden, entscheidend ist jedoch der Gehalt der Bodenlösung an antibiotisch wirksamen Stoffen.

Ophiobolus graminis paßt sich der Wuchsform eines anderen Bodenpilzes an, dringt in ihn ein und zersetzt ihn schließlich. Er erfährt dabei eine deutliche Entwicklungssteigerung. Es gibt also für das Zusammenleben von *Ophiobolus graminis* mit anderen Mikroben alle Übergänge von der Dyssymbiose (SCHAEDÉ), in der *Ophiobolus* dem Angriff der übrigen Bodenmikroben erliegt, über die Eusymbiose (SCHAEDÉ), in der *Ophiobolus* und die anderen Organismen sich einseitig oder gegenseitig aufsuchend, begleitend und in ihrer Wuchsform beeinflussend mit oder ohne einseitige oder gegenseitige Förderung zusammenleben, bis zur umgekehrten Form der Dyssymbiose, in deren Verlauf nun *Ophiobolus* seinen Partner parasitiert.

3. Der Einfluß der Rhizosphäre verschiedener Pflanzen auf die Entwicklung von *Ophiobolus graminis* wird dargelegt. Neben dem Nährstoffreichtum bestimmt anscheinend die antagonistische Pufferung der wurzelnahen Zone infolge qualitativer und quantitativer Besonderheiten der Mikrobenpopulation Wachstum, Wachstumsrichtung und Habitus des *Ophiobolus*-Myzels entscheidend.

Mein besonderer Dank gilt Frä. Hildegard SCHNEIDERS, die mir bei der Durchführung der Arbeiten und Anfertigung der Mikrobenphotographien unersetzliche Dienste leistete.

Literatur.

- BURGEFF, H.: Mycorrhiza. — Manual of Pteridology. The Hague 1938.
 DEMETER, K. J. und MOSSEL, H.: Über die Brauchbarkeit von *Cholodnys* mikroskopischer „Aufwuchsplattenmethode“ bei mikrobiologischen Bodenuntersuchungen. Zentralbl. f. Bakteriologie, Parasitenkunde u. Infektionskrankh. **88**, 2. Abt., 384, (1933).
 GARRETT, S. D.: Factors affecting the severity of take-all, Journ. Agric. South. Austral., **37**, 664, 799, 976 (1934). — GARRETT, S. D.: Decomposition of the resting mycelium of *Ophiobolus graminis* in infected wheat stubble
 Archiv für Mikrobiologie: Bd. 14. 18

buried in the soil. Ann. Appl. Biol. **24**, 747 (1937). — GARRETT, S. D.: The take-all disease of cereals. Imperial bureau of soil science, Technical communication No. 41, 1942. — GEITLER, L.: Beiträge zur Kenntnis der Flechtensymbiose. VI. Arch. f. Protistenkunde, **88**, 161 (1937).

MORITZ, O.: Weitere Studien über die *Ophiobolose* des Weizens. Arb. Biol. Reichsanstalt, **20**, 27 (1932).

SCHAEDE, R.: Die pflanzlichen Symbiosen. Jena 1943. — SCHMID, G.: Die Verpilzung aerophiler Luftalgen. Zum Flechtenproblem. Flora **28**, 211 (1933). — STILLE, B.: Untersuchungen über die Bedeutung der Rhizosphäre. Arch. Mikrobiologie, **9**, 477 (1938).

THOMAS, E. A.: Über die Biologie der Flechtenbildner. Beitr. z. Kryptogamenflora d. Schweiz. **9**, 1939. — TOBLER, F.: Die Flechten. Eine Einführung in ihre allgemeine Kenntnis. Jena 1934.

WEINDLING, R.: *Trichoderma lignorum* as a parasit of other soil fungi. Phytopathology **22**, 837 (1932). — WEINDLING, R.: Studies on a lethal principle effective in the parasitic action of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi. Phytopathology **24**, 1153 (1934). — WINTER, G.: Untersuchungen über den Einfluß biotischer Faktoren auf die Infektion des Weizens durch *Ophiobolus graminis*. Zeitschr. Pflanzenkr., **50**, 113 (1939 a). — WINTER, G.: Die Infektion des Weizens durch *Ophiobolus graminis* als Funktion der Bodenfeuchtigkeit. Zeitschr. Pflanzenkrankh. **50**, 326 (1939 b). — WINTER, G.: Der Einfluß partieller Sterilisation des Bodens auf die Entwicklung der Laufhyphen von *Ophiobolus graminis*. Phytopathol. Zeitschr. **14**, 204 (1942). — WINTER, G.: Eine Methode zur quantitativen Bestimmung des Wachstums parasitischer oder saprophytischer Pilze im natürlichen Boden. Festschrift Appel, Biol. Zentralanst., Berlin-Dahlem. 1947.

(Aus dem Botanischen Institut der Universität Münster/Westf.)

Die obligate Autotrophie der Nitrifikationsbakterien.

Von

H. BÖMEKE.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 26. Januar 1948.)

Wie allgemein bekannt ist (vgl. die Literatur in den 3 nachgenannten Arbeiten), üben lösliche organische Substanzen auf den Nitrifikationsvorgang einen hemmenden Einfluß aus. Es lag nun nahe nachzuprüfen, ob die für heterotrophe Mikroben so ausgezeichneten Nährstoffe wie Glykose, Bouillon usw. auf die autotrophen *Nitrifikanten* tatsächlich wie Gifte wirken, wie des öfteren behauptet wird. Denn aus einer Verzögerung der Nitrifikation kann nicht ohne weiteres auch auf eine Giftwirkung von seiten dieser Stoffe geschlossen werden, sondern es waren möglichst langfristige Versuche notwendig, in denen die Frage des tatsächlichen Absterbens der Zellen geprüft werden mußte. Vielleicht erschweren die organischen Verbindungen nur dem oxydierbaren Stickstoff den Zutritt zu den katalytisch wirkenden Zentren der Zellen (PANDALAI 1938) und setzen dadurch die Nitrifikationsgeschwindigkeit herab. Eine nachteilige Wirkung braucht darum nicht von diesen Stoffen auszugehen, im Gegenteil, sie könnten sogar den Stoffwechsel in einem gewissen Grade unterstützen (BOLTJES 1935). Eine Zellvermehrung wäre auch nicht unbedingt erforderlich. Diese könnte der autotrophen Phase vorbehalten bleiben. Den organischen Stoffen könnte lediglich die Aufgabe zugefallen sein, den *Nitrobakterien* über die Zeiten hinwegzuhelfen, wo kein nitrifizierbarer Stickstoff zur Verfügung steht. In Ermangelung der aus dem Nitrifikationsvorgang stammenden Energie könnten dann die organischen Verbindungen vielleicht nur die dissimilatorischen Vorgänge unterstützen. Wie die Dinge in Wirklichkeit liegen, darüber sollen uns die folgenden Versuche einige Klarheit verschaffen.

In meiner ersten Veröffentlichung über die Nitrifikation (BÖMEKE 1939) habe ich bereits dieses Problem angeschnitten, mußte aber die Frage damals mangels langfristiger Versuche unbeantwortet lassen. Im Laufe der verfloßenen Jahre habe ich diesen Gedanken wieder aufgegriffen und verschiedene Versuche in dieser Richtung angestellt, die im folgenden geschildert werden sollen.

Es wurden 100 ccm-fassende Erlenmeyerkölbchen mit je 25 ccm der üblichen Nitrifikationsnährlösung¹ beschickt. Vor dem Sterilisieren erhielt jeder Wattebausch eine Umhüllung aus Zellophanpapier. Diese schützte die Kulturen bis zum Abschneiden der Watte vor einer Fremdinfection. Nach Beendigung der Nitrifikation wurde mittels einer Pipette die zu untersuchende sterile organische bzw. anorganische Lösung zugefügt. Darauf wurden mit einem durch die Flamme gezogenen sterilen Messer die Wattebüsche unmittelbar über dem Erlenmeyerkolbchen abgeschnitten, die Schnittfläche mit einem Bunsenbrenner abgesengt und zuparaffiniert. Hierzu erwies sich am geeignetsten Paraffin mit einem Schmelzpunkt von 42° C. Nach der Beschickung mit der zu untersuchenden Lösung stellte ich die Kölbchen zunächst für eine Woche in den Brutschrank. Darauf wurden sie im Instituts Keller bei annähernd konstanter Temperatur von 19° C aufbewahrt.

Von diesen Kulturen erfolgten in gewissen Zeitabständen Rückimpfungen mit einer Platinöse in die normale Nitrifikationsnährlösung und in organische Testlösung. Trat in der Tochterkultur Nitrifikation ein, so galt die Mutterkultur als lebend und wurde in der Tabelle mit „L“ bezeichnet. blieb dagegen die Nitrifikation aus, so erhielt die Kultur das Zeichen „T“. Ob in diesen mit „T“ bezeichneten Kulturen nun tatsächlich sämtliche Bakterien tot waren, ist damit noch nicht gesagt. Doch darf man wohl annehmen, daß solche Kulturen zumindest geschädigt worden sind. Dies festzustellen, ist letzten Endes das Hauptbestreben meiner Untersuchungen gewesen.

War die Ausgangskultur bereits makroskopisch infiziert, so erhielt sie ein „I“. Zeigte die Abimpfung von einer Kultur in der Testlösung eine Infektion an, so vermerkte ich dies mit „i“ in der Tabelle. Kulturen, in denen bis zum Schluß weder makroskopisch noch mikroskopisch eine Verunreinigung festzustellen war, bezeichnete ich mit „R“. Bei den unbezeichneten Kulturen unterblieb der Reinheitstest.

Die Konzentrationen sind, wo es möglich war, in Volummolaritäten, sonst aber in Volumprozenten angegeben. Die gewöhnliche Bouillon mit 10 g Fleischextrakt, 10 g Pepton und 5 g NaCl im Liter wurde als 2,5%ig angenommen. Ebenso bezeichnete ich das Hefewasser als 2,5%ig, wenn das Filtrat von 25 g *Bäckerhefe*/Liter genommen wurde. Nährstoff-Heyden wurde unfiltriert verwendet. Diese Lösungen (10 ccm) wurden in einer 3,5 mal so hohen Konzentration zu der 25 ccm betragenden Kulturlösung zugefügt. Wenn man von einer Eindunstung der Nährlösung während der Versuchszeit absieht, entstehen die in den Tabellen angegebenen Werte.

I. Langfristige Einwirkung organischer und anorganischer Substanzen auf ausnitrifizierte Kulturen.

a) Nitratbildner.

Der Gesamtversuch mit dem *Nitratbildner* setzte sich aus 11 Reihen zu je 12 Kulturen zusammen. Die Nitrifikationsnährlösung war in sämtlichen 132 Kolben die gleiche und bei einer Temperatur von 30° C innerhalb 25 Tage bereits restlos nitrifiziert worden, als die Zusätze zu den Kolben zugefügt wurden. Die zu untersuchenden Lösungen wurden in vier Konzentrationsstufen je Reihe verwendet. Nach der Beschickung mit obigen Lösungen standen die zuparaffinierten Kulturen bis zur Rückimpfung 93 bzw. 482 Tage.

Die erste Abimpfung nach 93-tägiger Einwirkung einer 0,25%igen Bouillon nitrifizierte (Tab. I). Die zweite Rückimpfung nach 482 Tagen

¹ Siehe Arch. f. Mikrobiol. Bd. 14 S. 63.

zeigte keine Nitrifikation. Die Kultur erwies sich als unrein, und Zersetzungsprodukte der Fremdorganismen dürften die Ursache für das Ausbleiben der Nitrifikation in dieser Kultur gewesen sein.

In der nächst höheren Bouillonkonzentration (0,50%) lebten bei der ersten Rückimpfung noch die *Nitratbildner*; die zweite Rückimpfung ergab nur eine tote Tochterkultur. Leider war auch die Mutterkultur stark infiziert.

In der 1%igen Bouillonlösung waren sämtliche Stammkulturen infektionsfrei geblieben und hatten in beiden Rückimpfungen, sowohl nach 93 als auch nach 482 Tagen, lebensfähige Tochterkulturen ergeben.

Die 2,5%ige Bouillonlösung war ebenfalls ohne Fremdorganismen und brachte in der ersten Rückimpfung eine nicht nitrifizierende und eine nitrifizierende Tochterkultur; in der zweiten Rückimpfung wurde in beiden Tochterkulturen keine Nitrifikation beobachtet.

Nach diesen Ergebnissen mit Bouillonzusatz zu ausnitrifizierten *Nitrobacter*-Kulturen ist wohl der Schluß zu ziehen, daß niedere Bouillonkonzentrationen ($\leq 1\%$) über ein Jahr (16 Mon.) lang vertragen werden. Während dieser Zeit erlosch das Leben der *Nitratbildner* nicht, wenn wir von den beiden infizierten Kulturen absehen. Ein 2,5%iger Bouillonzusatz dagegen ist offenbar schädlich, bei längerer Einwirkung sogar tödlich. Mit diesem Ergebnis dürfte somit auch entschieden sein, daß der *Nitrobacter*-Stamm 14, mit dem ich sämtliche Versuche ausführte, in der zugesetzten Bouillon nicht heterotroph leben, geschweige sich vermehren kann. Auch die Nitratmenge, die der *Nitratbildner* bildet, kann nicht die Ursache des Absterbens gewesen sein, da die Kulturen ohne Zusatz organischer Substanzen (Reihe IX—XI) mit nur einer Ausnahme noch nach 16 monatigem Hungern nitrifikationsfähig blieben. Ebenso dürfte der osmotische Wert hier keine ausschlaggebende Rolle spielen, der in einer m/10 NaCl-Lösung doch größer ist, worin während der gleichen Zeitspanne keine einzige Kultur abgestorben ist, wie die Reihe IX zeigt. Es müssen somit schon die organischen Stoffe den Tod der *Nitrobacter*-Zellen in den höheren Bouillonkonzentrationen verursacht haben.

Die Förderung des Sauerstoffverbrauchs durch Bouillon, die ich (1939) an Hungerkulturen in der Warburgapparatur feststellen konnte, dürfte hiernach nicht als eine Heterotrophie gedeutet werden. Die beobachtete Atmungssteigerung ist nach diesen letzten Befunden wohl nur noch auf eine Reizwirkung von seiten der organischen Substanz zurückzuführen. Nach Zugabe der Bouillon treten vielleicht die *Nitrobacter*-Zellen in Abwehrreaktion gegen die eindringenden organischen Stoffe. Vermutlich ist die gesteigerte Atmung auch die Ursache des vorzeitigen Absterbens der Bakterienzellen. Auf jeden Fall dürfte aus diesem Versuch hervorgehen, daß die Bouillon kein brauchbares Nährmedium für den *Nitratbildner* darstellt.

Die gesamte Hefewasser-Serie mit 12 Kulturen war infektionsfrei. In sämtlichen Kolben befanden sich lebende *Nitrobacter*-Zellen, gleich-

Tab. I. *Einfluß organischer und anorganischer Substanzen auf den Nitratbildner-Stamm 14.*

Nr.	Zahl der Tage	I. Bouillon	II. Hefewasser	III. Nst.-Heyden	IV. Glykose	V. Na-Azetat	VI. Na-Lactat	VII. Asparagin	VIII. Harnstoff	IX. NaCl	X. Na ₂ SO ₄	XI. Wasser
1	93	LR 7,50	LR 7,76	LR 7,78	LR 7,79	LR 7,87	LR 7,82	LR 7,67	LR 8,01	LR 7,77	LR 7,84	LR 7,70
2	482	Tr _i	LR	LR	LR	LR	LR	LR	LR	LR	LR	LR
3	93	LR 7,49	LR 7,64	LR 7,80	LR 7,74	LR 7,85	LR 7,74	LR 7,60	LR 8,03	LR 7,76	LR 7,87	LR 7,76
4	93	LR 7,50	LR 7,65	LR 7,79	RR 7,64	LR 7,88	LR 7,80	LR 7,56	LR 8,15	LR 7,77	LR 7,86	LR 7,71
5	482	Tr _i	LR	Li	Li	LR	LR	LR	Tr	LR	LR	LR
6	93	LR 7,41	LR 7,59	LR 7,69	LR 7,67	LR 7,85	LR 7,77	LR 7,43	LR 8,30	LR 7,69	TR 7,89	LR 7,70
7	482	LR	LR	LR	LR	Li	Tr _i	Tr	LR	LR	LR	LR
8	482	LR	LR	LR	LR	Li	Tr	Tr	LR	LR	LR	LR
9	93	Tr 7,18	LR 7,45	LR 7,60	LR 7,51	LR 7,89	LR 7,83	LR 7,23	TR 8,52	LR 7,39	LR 7,93	LR 7,70
10	93	LR 7,20	LR 7,41	LR 7,62	LR 7,61	LR 7,90	LR 7,81	LR 7,14	TR 8,50	LR 7,69	LR 7,96	LR 7,70
11	482	Tr	LR	Li	LR	Li	Tr _i	Tr	LR	LR	LR	LR
12	482	Tr	LR	Li	Li	LR	Tr	Tr _i	Tr _i	LR	LR	LR

gültig in welcher Konzentration und nach welcher Zeitspanne untersucht wurde. Das mikroskopische Bild ergab eher eine Ab- als eine Zunahme der Bakterienzahl. Wir können also auch vom üblichen Hefewasser, das außer den lebensnotwendigen Nährstoffen das Zellteilungshormon Biotin enthält, keine Zellvermehrung selbst nach Jahren erzielen. Wie es mit stark verdünntem Hefewasser sich verhält, ist aus diesem Versuch nicht eindeutig zu erkennen. Wahrscheinlich ist jedoch, daß auch hier keine Heterotrophie vorliegt. Es dürfte lediglich ein Dahinvegetieren in Gegenwart von Hefewasser möglich sein, selbst über mehrere Jahre hindurch, mehr wohl nicht.

Das gleiche Ergebnis wie oben erhielt ich mit Nährstoff-Heyden. Es war keinerlei Zellvermehrung während der Einwirkung der organischen Substanz festzustellen. Die zwei infizierten Kulturen verhielten sich wie Reinkulturen und bewirkten keinen Verlust der Nitrifikationskraft. Mit Glykose-, Na-acetat- und Na-lactatzusatz wurde das gleiche Ergebnis erzielt.

Die beiden NH_2 -haltigen Stoffe, Asparagin und Harnstoff, unterscheiden sich in ihrer Wirkung auf die *Nitratbildner*-Zellen von den bisher untersuchten Substanzen. Während bei den m/100 oder m/50 Asparaginlösungen lebensfähige Abimpfungen erzielt wurden, waren bei den m/25 und m/20 Lösungen die 93-Tage-Kulturen lebend, die 482-Tage-Kulturen sämtlich tot. Aus diesem Befund möchte ich ableiten, daß das Asparagin schädlich auf die *Nitrobacter*-Zellen wirkt. Eine m/50 Asparaginlösung scheint noch erträglich zu sein. Von m/25 Asparaginlösung an wird anscheinend die Zelle derartig geschädigt, daß sie zwischen 93 und 482 Tagen Einwirkungsdauer dem Einfluß des Asparagins erliegt.

Bei Harnstoff liegen die Dinge etwas anders. Ein Zusatz von m/100 Harnstofflösung ist vielleicht völlig belanglos. In einer m/50 harnstoffhaltigen Lösung leben die *Nitrobacter*-Zellen zwar noch 93 Tage. Nach 482-tägiger Einwirkung sind die Zellen bereits abgestorben; das gleiche gilt für sämtliche höheren Konzentrationen. Nur nach 93-tägiger Einwirkung nitrifizierte aus m/25 Lösung noch die Abimpfung; eine m/10 Harnstofflösung wirkte selbst nach 93 Tagen bereits tödlich. Zwei Ursachen kann man für diesen Unterschied anführen: Es könnten 1. die Stoffe Asparagin und Harnstoff spezifisch wirken; 2., was wahrscheinlicher ist, sich aus dem Harnstoff in Vergleich zum Asparagin mehr freies Ammoniak gebildet haben, wie der höhere p_{H} -Wert dieser Reihe vermuten läßt, und die Erscheinung auf eine Ammoniakvergiftung letzten Endes zurückzuführen sein. Denn gerade der *Nitratbildner* ist, wie die Untersuchung mit Ammonsulfat gezeigt hat, äußerst empfindlich gegen NH_3 -Moleküle.

Außer diesen organischen Substanzen habe ich gewissermaßen als Kontrolle mit gleicher Molarität noch zwei anorganische Salze, Natriumchlorid und Natriumsulfat, geprüft. Wie ein Blick auf die Tabelle I lehrt, ist in keiner Kultur, ganz gleich in welcher Konzentration und nach welcher Zeit untersucht wurde, abgesehen von einer

Kultur mit Na_2SO_4 , die Nitrifikation erloschen. Die Ausnahme dürfte als Zufall zu bewerten sein. Selbst die höchsten Konzentrationen haben in keiner Weise einen schädigenden Einfluß auf die *Nitrobacter*-Zellen ausgeübt. Ebenso dürfte von den Salzen der Nährlösung keine tödliche Wirkung ausgehen. In den Fällen, wo in den Kulturen mit organischen Lösungen ein Absterben beobachtet wurde, ist dies wohl ausschließlich der Wirkung der betreffenden Stoffe zuzuschreiben. Dabei muß beim *Nitratbildner* die Giftwirkung des freien Ammoniaks bei solchen Untersuchungen mit in Erwägung gezogen werden.

b) *Nitritbildner*.

Die Parallelversuche mit den *Nitritbildnern* stießen, wie vorausszusehen war, auf die denkbar größten Schwierigkeiten. In erster Linie macht sich die Konzentrationserhöhung der Nährlösung während der Nitrifikation durch Umwandlung des schwer löslichen Calciumkarbonats in löslichere Calciumverbindungen äußerst ungünstig bemerkbar. Weiterhin sinkt der pH -Wert, und das Oxydationsprodukt des Ammoniaks, das Nitrit, wirkt auf die Dauer höchstwahrscheinlich giftig auf die *Nitrosomonas*-Zellen ein. Hierzu kommt noch, daß die von mir untersuchten *Nitrosomonas*-Stämme ihr Nitrifikationsoptimum bei $36-37^\circ\text{C}$ haben, während für den *Nitratbildner* bei 30°C noch optimale Bedingungen herrschen. Dadurch ist ein größerer Wasserverlust der Nährlösung unvermeidlich. Durch diese Schwierigkeiten bedingt, kam es, daß die ersten drei Versuche fehlschlagen.

Ich stellte daher eine 4. Versuchsreihe an, diesmal ohne NaCl und Na_2SO_4 . Die 108 Erlenmeyerkölbchen konnte ich bereits nach 38 Tagen zuparaffinieren. Den Versuch änderte ich dem vorigen gegenüber insofern ab, als ich nur die höchsten und niedrigsten Konzentrationen an *Stamm 44* prüfte und an *Stamm 32* nur die höchste. Der *Nitratbildner* wurde nicht zugeimpft.

Leider sind die Versuchsergebnisse (Tab. II) durch zahlreiche Infektionen getrübt. Trotzdem bringe ich diesen Versuch, weil mir der Einfluß der Infektion unwesentlich erscheint. Von der Bouillonreihe in der niederen Konzentration nitrifizierten sämtliche Abimpfungen. Die hohen Konzentrationen dagegen lieferten ausnahmslos tote Tochterkulturen sowohl beim *Stamm 44* als auch bei 32.

Wenn wir von der einen Ausnahme (*Stamm 32 II*₄) absehen, brachte der Versuch mit Hefewasserzusatz das vollkommen gleiche Ergebnis. In der niederen Konzentration wurden wieder lebende Abimpfungen gefunden, in der hohen waren sie tot.

Sehr ähnlich war auch das Ergebnis mit Nährstoff-Heyden. Die nicht nitrifizierende Kultur (*Stamm 44 III*₁) in der niedrigsten Verdünnungsreihe kann nicht als die Regel angesehen werden. In gleicher Weise dürfte die lebende Kultur von *Stamm 32 III*₄ als Ausnahme zu deuten sein.

Die Glykosereihe brachte mit einer Ausnahme in der niederen Konzentration lebende, in der hohen Konzentration nur tote Tochterkulturen.

Die Na-acetatreihe ergab, von zwei Ausnahmen abgesehen, 10 Tochterkulturen, die Nitrit bildeten. Selbst eine m/10 Na-acetatlösung

Tab. II. Einfluß organischer Substanzen auf die Nitrifikationsbakterien.

Nr.	Zahl der Tage	I.		II.		III.		IV.		V.		VI.		VII.		VIII.		IX.	
		Bouillon		Hefewasser		Nst.-Heyden		Asparagin		Harnstoff		Glykose		Na-Acetat		Na-Lactat		Wasser	
		0,25 %		0,25 %		0,10 %		m/100		m/100		m/100		m/100		m/100		H ₂ O	
1	116	L _i		L _i		TR		TR		TR		TR		TR		TR		TR	
2		L _i 7,29		LR 7,39		LR 7,14		L _i 7,03		LR 7,02		LR 6,65		L _i 7,50		L _i 7,76		LR 7,27	
3	149	L _i 7,43		L _i 7,50		L _i 7,21		L _i 7,00		LR 7,05		LR 7,64		LR 7,15		L _i 8,25		LR 6,93	
4		LR 7,96		LR 7,30		L _i 7,21		LR 7,44		LR 7,26		LR 7,41		LR 7,74		TR 7,90		TR 7,01	
		2,50 %		2,50 %		1,00 %		ca m/20		m/10		m/10		m/10		m/10		H ₂ O	
5	116	TR 8,78		T _i 7,94		TR 7,01		T _i 9,00		LR 7,49		TR 7,64		TR 9,43		T _i 8,04		LR 7,29	
6		TR		TR		TR		TR		LR		TR		LR		LR		LR	
7	149	TR 8,61		TR 6,65		TR 7,40		T _i 8,88		LR 7,05		TR 7,29		LR 7,65		LR 7,69		TR 7,56	
8		TR 8,35		T _i 7,37		T _i 7,19		TR 7,34		LR 7,49		TR 7,51		LR 8,78		LR 8,12		LR 7,38	
Stamm 32:		2,50 %		2,50 %		1,00 %		ca m/20		m/10		m/10		m/10		m/10		H ₂ O	
1	122	T _i		T _i		T _i		TR		TR		T _i		L _i		L _i		L _i	
2		TR 8,23		T _i 7,88		T _i 8,18		TR 8,72		TR 8,58		TR 7,60		L _i 8,60		L _i 8,09		L _i 7,42	
3	172	T _i 8,44		T _i 7,95		T _i 8,15		T _i 8,90		TR 8,53		T _i 7,74		L _i 9,18		L _i 8,26		L _i 7,22	
4		T _i 8,19		LR 7,14		LR 7,73		TR 8,54		TR 8,50		TR 7,64		LR 9,61		LR 8,24		LR 7,41	

zu der ausnitrifizierten *Nitrosomonas*-Kultur hatte also die Bakterien trotz starken Alkalitätsanstiegs nicht zum Absterben gebracht.

Ein ähnliches Ergebnis lieferte die Reihe mit Na-lactatzusatz. Die zwei nicht nitrifizierenden Tochterkulturen in der niedrigen Verdünnung dürfen wie in der Na-acetatreihe wohl als Ausnahmen bezeichnet werden.

Die beiden Reihen Asparagin und Harnstoff verhalten sich in der niederen Konzentration gleich. Die zwei toten Tochterkulturen können als Ausnahmen, aber auch bereits als Andeutung einer schwachen Giftwirkung in dieser Verdünnung betrachtet werden. Für Harnstoff scheint jedoch eine Giftwirkung nach den Ergebnissen mit den höheren Konzentrationen wenig wahrscheinlich. Während nämlich eine m/20 Asparaginlösung ausnahmslos tödlich wirkt, brachte eine m/10 Harnstofflösung noch lebende Tochterkulturen. Das mikroskopische Bild ergab in letzteren Kulturen eine Menge von *Nitrosomonas*-Zellen. Es liegt hier die Vermutung nahe, daß unter den herrschenden Versuchsbedingungen (Temperatur, Alkalität) in gewissem Umfang Ammoniak aus dem Harnstoff abgespalten und nachträglich nitrifiziert wurde. Die Kulturen blieben somit am Leben, während beim Asparagin entweder kein Ammoniak abgespalten wurde oder die organische Substanz die Nitrifikation hemmte. Beim *Stamm 32* sehen wir das eigentlich erwartete Ergebnis mit lauter toten Kulturen in der Harnstoffreihe.

Da die Kontrollen beim *Stamm 44* auch einige nichtnitrifizierende Rückimpfungen brachten, gewinnt es an Wahrscheinlichkeit, daß die nichtnitrifikationsfähigen Abimpfungen von den Kulturen niederer Konzentration als Ausnahmen zu bewerten sind. Das vorzeitige Absterben der Kontrollen ist vielleicht auf zu hohe Konzentrationen der Kulturlösung zurückzuführen. (Durch die niedrigkonzentrierten Zusätze wurden die Lebensbedingungen für die *Nitritbildner* in diesen Kulturen wahrscheinlich sogar verbessert).

II. Langfristige Einwirkung von Bouillon auf frischbeimpfte Kulturen in Abwesenheit oxydierbaren Stickstoffs.

Nitrit- und Nitratbildner.

Da im Voraufgegangenen keine eindeutige Heterotrophie auf organ. Substrat in ausnitrifizierter Nährlösung nachzuweisen war, versuchte ich nun in Gegenwart von Bouillon und der üblichen Nährlösung für *Nitrobacter*, die jedoch von vornherein Natriumnitrat statt Natriumnitrit enthielt, die Bakterien zur Zellteilung anzuregen. Die Problemstellung dieses Versuches war: Wenn sich die *Nitrifikanten* in Bouillon vermehren können, wird man nach einem Jahr mehr Bakterien in der Kultur vorfinden als eingeeimpft wurden.

Die Kulturen wurden ähnlich den vorherigen in Erlenmeyerkölbchen mit 25 ccm Nährlösung angesetzt. Die Kölbchen wurden mit einer Platinöse beimpft, darauf sofort zuparaffiniert und im Keller aufbewahrt. Der gesamte Versuch bestand aus 30 Kulturen: 10 davon waren nur mit der üblichen Bouillon beschickt, 10 erhielten 20 ccm Nährlösung und 5 ccm Bouillon: 10

gekamen nur 25 ccm anorganische Nährlösung. Die eine Hälfte der Kulturserien wurde mit dem *Nitrit-* (Stamm 32), die andere mit dem *Nitratbildner* (Stamm 14) beimpft. Die Rückimpfung erfolgte ein Jahr später in die übliche Nitrifikationsnährlösung.

Das Ergebnis dieser Rückimpfung bringt die Tab. III. Die Kontrollen ohne Bouillonzusatz zeigten, wie zu erwarten war, keinerlei Zellvermehrung. Daß die Nitrifikanten innerhalb Jahresfrist in einer verschlossenen Flüssigkeitskultur, die keine Giftstoffe enthält, nicht absterben, ist durch den Versuch über die Lebensdauer der Nitrifikationsbakterien bereits bewiesen (BÖMEKE 1948). Wenn eine Impföse in 25 ccm suspendiert wird, ist die Verdünnung so groß, daß, wenn keine Ver-

Tab. III. Langfristiger Bouillonversuch in Gegenwart von CO_2 und Abwesenheit von oxydierbarem Stickstoff.

Nitrosomonas

Kolben-Nr	1	2	3	4	5
Bouillon	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)
Nährlösung + Bouillon	—	—	—	—	—
Nährlösung	—	—	—	—	—

Nitrobacter

Bouillon	+	(—)	+	(—)	(—)
Nährlösung + Bouillon	+	+	+	+	+
Nährlösung	—	—	—	—	—

mehrung der Individuenzahl erfolgt, wahrscheinlich bei einer Rückimpfung mit einer Impföse kein Bakterium erfaßt wird. Nach diesem zu urteilen, dürfte beim *Nitrosomonas*-Stamm 32 keine Zellvermehrung in Bouillon bzw. Nährlösung + Bouillon stattgefunden haben. Die leichte Nitritbildung in den Bouillontochterkulturen ist sehr wahrscheinlich auf nicht bakteriologischem Wege entstanden zu denken. Eine Heterotrophie auf Bouillon für den *Nitritbildner*-Stamm 32 ist aus diesen Versuchsergebnissen nicht abzuleiten.

Beim *Nitratbildner* liegen freilich die Dinge etwas eigenartig. Rückimpfungen von den Kontrollkulturen (anorganische Nährlösung) zeigten wie beim Nitritbildner keine Nitrifikation. Dagegen waren Abimpfungen von Kulturen mit Bouillonzusatz (Nährlösung + Bouillon) in sämtlichen Fällen positiv; von der ungemischten Bouillon nitrifizierten ebenfalls 2 von 5 Abimpfungen.

Wie ist nun dieses Ergebnis zu erklären? Ist es nur Zufall, oder haben sich die *Nitratbildner* tatsächlich in der Bouillon vermehrt? Vor-erst muß diese Frage noch unbeantwortet bleiben. Merkwürdig ist

allerdings dieses Ergebnis, da aus ein und demselben Stammkölbchen sämtliche 15 Kulturen vor einem Jahr mit einer gleich großen Impföse beimpft worden waren und nur gerade die Kulturen anscheinend die meisten *Nitrobacter*-Zellen aufwiesen, welche in Kölbchen mit Bouillonzusatz sich befanden. Bemerkt sei hier noch ausdrücklich, daß alle Kulturen einwandfreie Reinkulturen waren. An eine Zersetzung der Bouillon unter Bildung von oxydierbarem Stickstoff ist also nicht zu denken.

III. Kurzfristige Einwirkung organischer Substanzen in Gegenwart oxydierbaren Stickstoffs bei An- bzw. Abwesenheit von Kohlensäure.

a) Nitratbildner.

Bouillon.

Wenn auf Bouillon tatsächlich eine Heterotrophie des *Nitratbildners* vorgelegen hat, müßte auch ohne CO_2 eine Zellvermehrung eintreten. Zu diesem Zweck konstruierte ich Spezialkölbchen (Abb. 1) mit einem Einsatz im Innern für die Aufnahme von KOH. Durch Glasschliffstöpsel konnte das Innere dieser Gefäße vollkommen von der Außenluft abgeschlossen werden. Rings um den KOH-Einsatz befand sich die Nährlösung.



Abb. 1. Spezialkölbchen zur CO_2 -freien Kultur von *Nitrobacter*. KOH (Kallauge), N (Nährlösung).

Die Versuchsanordnung war folgendermaßen: Der Gesamtverbrauch setzte sich aus 18 Kulturen zusammen. Von diesen wurden 6 CO_2 -frei in den Spezialkölbchen gezüchtet; die übrigen 12 Kulturen befanden sich in gewöhnlichen, mit Watte verschlossenen Erlenmeyerkölbchen. Die Hälfte der Gefäße jeder Gruppe erhielt einen Zusatz von 1:4 verdünnter Bouillon, die andere Hälfte bekam statt Bouillon destilliertes Wasser. In den Einsatzgefäßen der Spezialkölbchen befanden sich 2 ccm einer 10%igen KOH-Lösung. Als Kulturlösung wählte ich die übliche nitrithaltige *Nitrobacter*-Nährlösung, von der 8 ccm in die Spezialkölbchen und 20 ccm in die Erlenmeyerkölbchen gefüllt wurden. Beimpft wurden am 11. 11. 42 mit einer Platinöse sämtliche Kölbchen aus einer Stammkultur. Das erste Mal wurde geprüft am 9. 12. 42, das zweite Mal mit dem gleichen Resultat am 8. 1. 43.

Das Ergebnis (Tab. IV) ist klar und eindeutig. Eine Heterotrophie des *Nitratbildners* auf Bouillon hat nicht vorgelegen. Denn in Abwesenheit von CO_2 tritt keine Zellvermehrung ein. Es ist völlig gleichgültig, ob Bouillon zugegen ist oder nicht. Dagegen haben sämtliche Kulturen in Gegenwart von CO_2 das gebotene Nitrit zu Nitrat oxydiert, ohne Bouillonzusatz allerdings schneller als mit diesem Zusatz. Hätte eine Ernährung von dieser Substanz stattgefunden, müßte die N-Oxydation in letzterem Falle wegen der größeren Zahl der Bakterien schneller verlaufen sein. Das Gegenteil war aber der Fall. Während die bouillonfreien Kulturen längst ausnitrifiziert waren, zeigte die Nährlösung der bouillonhaltigen Kulturen noch kräftige Nitritreaktion.

Das im vorigen Versuch geschilderte Ergebnis dürfte nur so zu verstehen sein, daß die Bakterien in Gegenwart der Bouillon zwar nicht absterben, sondern die Zellverbände (Kahmhäute!) zerfallen, wodurch eine Vermehrung der Individuenzahl vorgetäuscht wird. Daß mit der gleich großen Impföse mehr *Nitrat*- als *Nitritbildner* übertragen werden,

Tab. IV. Kurzfristiger Bouillonversuch bei Gegenwart bzw. Abwesenheit von CO_2 in oxydierbarer Nährlösung.

Kolben Nr.	Nitrobacter-Nährlösung			
	CO_2 -haltig		CO_2 -frei	
	H_2O	Bouillon	H_2O	Bouillon
1	+	(+)	—	—
2	+	(+)	—	—
3	+	(+)	—	—
4	+	(+)	—	—
5	+	(+)	—	—
6	+	(+)	—	—

(+) noch nicht restlos zu Ende nitrifiziert.

habe ich stets beobachten können. Damit ist auch wohl zu erklären, daß vom *Nitritbildner* keine lebende Abimpfung zu erhalten war. Die Individuenzahl war so gering, daß ohne Zellvermehrung des *Nitritbildners* in Bouillon keine lebenden Individuen erfaßt werden konnten. Beim *Nitratbildner* liegen die Dinge anders, falls die Kahmhäute zerfallen würden. Wie die mikroskopische Untersuchung ergab, waren nur Einzelindividuen, nicht Kahmhäute, bei den Rückimpfungen in den Mutterkulturen zu finden. Damit dürfte wohl das Problem gelöst sein und eine Heterotrophie des *Nitratbildners* auf Bouillon nicht vorgelegen haben.

Glykose.

Für den nun folgenden Versuch mit Glykose nahm ich nochmals den *Nitratbildner*, weil dieser bekanntlich weniger empfindlich gegen organische Stoffe ist als der *Nitritbildner*.

COLEMAN (1908) gibt an, daß kleine Mengen Dextrose in nitrifizierenden Reinkulturen verschwinden und das Wachstum der Nitrifikationserreger beschleunigten. Im Boden wirke die Dextrose sogar bis zu 0,5% nitrifikationsfördernd. ENGEL (1934) führt die Förderung der Nitrifikation im Boden durch Dextrose auf eine Begünstigung der N-bindenden Bakterien zurück. Nach Erschöpfung des Zuckers sterben dann später die N-bindenden Bakterien ab, und der bei der Zersetzung der Zelle freiwerdende Stickstoff wird nitrif-

fiziert, wodurch eine Förderung der Nitrifikation durch Zucker vorgetäuscht wird. Im Folgenden soll nun der Beweis erbracht werden, daß auf Glykose keine Heterotrophie vorliegt.

Die Versuchsanordnung war folgendermaßen: Die im vorigen Versuch verwendeten Spezialkölbchen mit 2 ccm 10%iger KOH-Lösung im Einsatzgefäß erhielten 8 ccm der üblichen nitrithaltigen Nährlösung für den *Nitratbildner*. Nach vorausgegangener Sterilisation wurden unter sterilen Bedingungen zu den Kölbchen 2 ccm Glykoselösung zugeführt, so daß eine 0,25%ige Zuckerlösung entstand; zu den andern drei Gefäßen gab ich (statt Glykose) destilliertes Wasser. Absichtlich war die Glykosekonzentration so niedrig gewählt, damit eine Nitrifikation ohne weiteres möglich war.

Als Kontrollen zu den 6 CO₂-freien Kulturen dienten 12 weitere Kulturen in Erlenmeyerkölbchen in Gegenwart gewöhnlicher CO₂-haltiger Luft. Die eine Hälfte dieser Kölbchen bekam den gleichen Glykosezusatz wie die CO₂-freien Kulturen, die übrigen 6 erhielten die entsprechenden Mengen aqua dest an Stelle der Glykose. Am 24.9.42 erfolgte die Beimpfung, 23 Tage später die Prüfung auf Nitritschwund.

Das Ergebnis dieses Versuches am Prüftage ist aus Tab. V zu er-

Tab. V. Kurzfristiger Glykoseversuch bei Gegenwart bzw. Abwesenheit von CO₂ in oxydierbarer Nährlösung.

Kolben Nr.	Nitrolacter-Nährlösung			
	CO ₂ -haltig		CO ₂ -frei	
	H ₂ O	Glykose	H ₂ O	Glykose
1	+	+	—	—
2	+	+	—	—
3	+	+	—	—
4	+	+		
5	+	+		
6	+	+		

sehen. Die CO₂-freien Kulturen brachten ohne Ausnahme sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von Glykose ein negatives Resultat. Die CO₂-haltigen Kulturen dagegen nitrifizierten sämtlich. Am Prüftage lag in diesen Kulturen das zugefügte Nitrit restlos als Nitrat vor, die Abimpfungen von diesen Tochterkulturen nitrifizierten ebenfalls.

Nun könnte jemand einwenden, eine Nitrifikation sei zwar im CO₂-freien Raum nicht möglich, aber eine Zellvermehrung könnte vielleicht in Gegenwart von Glykose stattgefunden haben. Auch dieser Einwand läßt sich leicht entkräften. Die mikroskopische Untersuchung der CO₂-frei gehaltenen Glykosekulturen ergab nämlich keinerlei Andeutung

einer Zellvermehrung. Mit diesem Versuch dürfte eindeutig der Beweis geliefert sein, daß auf Glykose selbst in Gegenwart oxydierbaren Stickstoffs keine Heterotrophie möglich ist.

Diesen Versuch auch noch mit dem *Nitritbildner* zu wiederholen, schien mir wenig Erfolg zu versprechen, da die organischen Substanzen während des Nitrifikationsprozesses noch stärker hemmend auf den *Nitrit-* als auf den *Nitratbildner* wirken. Es scheint so zu sein, daß Substanzen, welche den Nitrifikationsprozeß schädlich beeinflussen, auch nicht als Nährsubstrat für die Nitrifikationsbakterien dienen können.

b) *Nitritbildner*.

Natriumacetat.

Nach den Angaben von Hes (1937) sollen fettsaure Salze sich besonders vorteilhaft auf *Nitrosomonas*-Zellen auswirken, ja es wird auf Na-Acetat sogar eine Zellvermehrung vermutet, was mit andern Worten bedeutet, daß der *Nitritbildner* heterotroph leben kann.

Um dieses Ergebnis nachzuprüfen, wiederholte ich den vorigen Versuch mit Na-Acetat. An Stelle der Glykose wurde eine Na-Acetatlösung genommen, die durch die Verdünnung mit der Nährlösung 0,05%ig wurde. Dies war die gleiche Konzentration, welche auch Hes für seine Untersuchungen verwendete. Die Nitrifikationsnährlösung mußte ich jedoch dahin abändern, daß ich statt 10 g Magnesiumkarbonat nur 6 g Calciumkarbonat/Liter Leitungswasser nahm, weil es mir unmöglich war, während des Nitrifizierens bei 35°C das Ammoniak in der Kulturflüssigkeit zu behalten, obwohl das Magnesiumkarbonat und das Natriumacetat getrennt sterilisiert und beide erst nach dem Sterilisieren zu der Nährlösung gefügt wurden. Beimpft wurde sie mit dem *Nitrosomonas*-Stamm 32, der Schwärmer bildete und ein N/C-Verhältnis von 35:1 hatte. Geprüft wurden die Kulturen 23 Tage nach der Beimpfung.

Das Versuchsergebnis ist in Tab. VI zu finden. Alle Kulturen in Gegenwart von CO₂ nitrifizierten, in Abwesenheit von CO₂ dagegen nicht. Die mikroskopische Prüfung der CO₂-freien Acetatkulturen ergab ebenso wenig eine Bakterienvermehrung wie die CO₂-freien Kontrollkulturen. Während zwischen den CO₂-freien Kulturen kein Unterschied bestand, zeigten die Kulturen in Gegenwart von CO₂ insofern eine Besonderheit, als die Acetatkulturen etwas rascher NH₃-frei wurden als die ohne Acetatzusatz.

Ohne CO₂ können also die *Nitrosomonas*-Zellen nicht von Na-Acetat leben. Dies haben das Ausbleiben der Nitrifikation und die mikroskopische Untersuchung ergeben. In Gegenwart von CO₂ verschwindet allerdings in Übereinstimmung mit den Angaben von Hes das Ammoniak schneller aus den Na-Acetatkulturen als aus solchen ohne diesen Zusatz. Es wären zwei Möglichkeiten zu erwägen: 1. Auf Acetat ist in Gegenwart von CO₂ neben der Autotrophie eine Heterotrophie möglich; durch Acetat wird der Stoffwechsel des *Nitritbildners* irgendwie begünstigt. Es bilden sich daher mehr Bakterien, und aus diesem Grunde wird das Ammonsalz schneller nitrifiziert. 2. Durch Zusatz von Na-Acetat tritt eine Reaktionsverschiebung zum Optimum ein.

Tab. VI. Kurzfristiger Na-Azetatversuch bei Gegenwart bzw. Abwesenheit von CO_2 in oxydierbarer Nährlösung.

Kolben Nr.	Nitrosomonas-Nährlösung				
	CO_2 -haltig		CO_2 -frei		
	H_2O	pH	Na-Azetat	pH	H_2O Na-Azetat
1	(+)	7,00	+	7,23	— —
2	(+)	7,02	+	7,26	— —
3	(+)	7,10	+	7,18	— —
4	(+)	7,04	+	7,25	
5	(+)	7,08	+	7,23	
6	(+)	7,02	+	7,29	

(+) = Spur NH_3 .

Die Nährlösung wird stärker alkalisch. Es verflüchtigt sich aus einer Nährlösung mit Na-Azetat einerseits mehr NH_3 als aus einer weniger alkalischen Lösung ohne Na-Azetatzusatz; andererseits oxydieren die Bakterien in der Nähe ihres Optimums rascher Ammoniak. Da das Optimum für meine *Nitritbildner* bei 7,5—7,8 liegt, sind die Na-Azetatkulturen reaktionsmäßig den Kontrollen gegenüber im Vorteil.

Wenn Hes nun bei der Kohlenstoffbestimmung in Kulturen mit fettsauren Salzen mehr Kohlenstoff findet, so besagt das nichts für eine Ernährung der *Nitrifikanten* auf fettsauren Salzen. Aus eigener Erfahrung ist mir bekannt, wie schwierig es ist, die letzten Spuren eines Stoffes aus Bakterienkulturen zu entfernen. Selbst Spuren, die mit Reagentien nicht mehr nachweisbar sind, können bei der C-Bestimmung zu falschen Werten führen. Es ist also möglich, daß Hes nicht die letzten Spuren der Essigsäure aus seinen Kulturen entfernt hat und so zu der Auffassung kam, die Azetatkulturen bildeten mehr Kohlenstoff bei der Oxydation gleicher Ammoniakmengen als die acetatfreien.

Schlußbetrachtung.

Überblicken wir noch einmal die gesamten Versuchsergebnisse über das Verhalten der *Nitrifikanten* in organischen Medien, so dürfen wir wohl mit einer gewissen Berechtigung annehmen, daß die organischen Substanzen in den von mir angewandten höheren Konzentrationen auf die Dauer mehr oder minder schädigend auf die Nitrifikantenzellen eingewirkt haben. Was also die N-Oxydation hemmt, schädigt auch die Zellen und wirkt unter Umständen tödlich. An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, daß die löslichen organischen Stoffe, wie sie in der Natur vorkommen, in der Regel in weit geringeren Konzentrationen auftreten

als die von mir geprüften. In einem gesunden Acker findet man vorwiegend Nitrate und nur äußerst selten Ammoniak und Nitrite. Diese Tatsache beweist uns, daß die Konzentration der löslichen organischen Substanzen sehr gering sein muß. Und wenn die Nitrifikation nicht einmal gehemmt wird, wieviel weniger können dann erst die Bakterien abgetötet werden. Denn zwischen den hemmenden und tödlich wirkenden Konzentrationen besteht eine große Spanne. Vermutlich wirken die organischen Stoffe teilweise spezifisch, d. h. es sind graduelle Unterschiede vorhanden. Diese könnten vielleicht bei einigen, z. B. Harnstoff, in der Abspaltung von Ammoniak zu suchen sein. Es dürften aber auch noch andere Momente hinzukommen. Welcher Art diese sind, ist einstweilen noch nicht zu sagen.

Eins ist jedoch sicher, daß die von mir untersuchten *Nitrifikanten* nicht heterotroph zu leben vermögen von den Stoffen und in den Konzentrationen und in der Zusammensetzung der Nährlösung, wie ich sie ihnen dargeboten habe. Wenn nämlich eine Heterotrophie vorgelegen haben sollte, dann hätten gerade nach $\frac{1}{2}$ -jähriger und längerer Einwirkungsdauer der organischen Substanzen unter Berücksichtigung des sehr trägen Stoffwechsels die Rückimpfungen von solchen Substraten mehr lebende Bakterien ergeben müssen als in den Abimpfungen nach 1—2 Monaten. Das Umgekehrte aber war stets der Fall. Es könnte nur noch sein, daß bei einer ganz bestimmten Konzentration und vielleicht auch in Verbindung mit gewissen Salzen doch eine Heterotrophie möglich ist. Denkbar wäre das, doch die Wahrscheinlichkeit, daß es so ist, ist sehr gering.

Wenn wir bedenken, daß die *Nitrifikanten* viele Jahre (BÖMEKE 1948) im Hungerzustande sich erhalten können, ohne die Lebenskraft einzubüßen, so ist es gar nicht verwunderlich, daß organische Verbindungen für sie belanglos sind. Es erscheint uns nur unwahrscheinlich, daß von den *Nitrifikanten* gerade die fast überall im Boden vorhandenen organischen Verbindungen verschmäht werden, von denen das riesige Heer der heterotrophen Organismen lebt. Es dürfte vielleicht so sein, daß den *Nitrifikanten* die Enzyme fehlen, die diese zum größten Teil doch recht kompliziert gebauten organischen Verbindungen aufzuschließen vermögen.

Mit obigen Versuchen über den Nachweis einer eventuell vorkommenden Heterotrophie auf den sämtlichen von mir untersuchten organischen Stoffen dürfte wohl endgültig der Beweis erbracht sein, daß die untersuchten *Nitrifikanten*-Stämme *obligat autotroph* sind. Daß es auch fakultativ autotrophe oder gar heterotrophe Nitrifikationserreger gäbe, wäre an und für sich denkbar, daß sich aber autotrophe *Nitrifikanten* in heterotrophe umzüchten lassen, ist nach meinen Erfahrungen höchst unwahrscheinlich. Ergebnisse, die eine Heterotrophie vorgetäuscht hatten, haben sich bei gewissenhafter Nachprüfung als irrig erwiesen. Meiner Meinung nach vermögen die üblichen *Nitrifikationsbakterien*, welche die Chemosynthese durchführen, nur obligat autotroph zu leben. Eine Anpassung an organisches Substrat erscheint

mir unmöglich. Eine Umzüchtung auf heterotrophe Formen ist mir nicht gelungen. Selbst durch jahrelange Einwirkung organischer Stoffe haben sich keine heterotrophen *Nitrifikationserreger* herauszüchten lassen.

Zusammenfassung.

1. Langfristige Einwirkung organischer Stoffe wie Bouillon, Hefewasser, Nährstoff-Heyden, Glykose usw. auf *Nitrifikationsbakterien* in ausnitrifizierter Nährlösung führte zu einer Zellschädigung.

2. Eine Zellvermehrung auf organischer Substanz wurde in keinem Fall beobachtet, ebensowenig gelang eine Umzüchtung autotropher Formen in heterotrophe.

Literatur.

BOLTJES, K.: Arch. f. Mikrobiologie **6**, 79—138 (1935). — BÖMEKE, H.: Arch. f. Mikrobiologie **10**, 385—445 (1939). — BÖMEKE, H.: Archiv für Mikrobiologie **14**, 63—98 (1948). — COLEMAN, L. C.: Ztbl. f. Bakteriologie II **20**, 401—420, 484—513 (1908). — ENGEL, H.: Ztschr. f. Bakteriologie II **90**, 385—397 (1934). — HES, J. W.: Rec. des trav. bot. néerl. **34**, 233—277 (1937). — PANDALAI, K. M.: Biochem. Ztschr. **299**, 406—415 (1938).

Sporobolomyces holsaticus n. sp.

Von

SIEGFRIED WINDISCH¹.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 31. Januar 1948.)

Es gelang 1938, von *Futterhefe* einen hefeähnlichen, roten Pilz zu isolieren. Morphologisch unterschied er sich von der Gattung *Rhodotula* durch das Vorhandensein von Myzelformen und die offenbare Abschleuderung von Sporen oder Konidien, die an der gegenüberliegenden Glaswand des Kulturglases haften blieben. Es lag daher nahe, ihn als zur Gattung *Sporobolomyces* gehörig zu betrachten.

Über die bisher bekannten Arten der Gattung *Sporobolomyces* liegen zahlreiche Arbeiten (s. u.), darunter eine Bearbeitung von DERX vor mit einem Bestimmungsschlüssel, nach dem es jedoch nicht gelang, den Pilz zu bestimmen. Daher wurde der Pilz an das Centraalbureau voor Schimmelcultures in Baarn, Holland, geschickt, wo Fräulein Dr. H. A. DIDDENS feststellte, daß der Pilz eine neue Art der Gattung *Sporobolomyces* darstellt.

Ehe die Beschreibung dieser neuen Art folgt, möge es erlaubt sein, darauf hinzuweisen, daß die beiden in der Literatur erwähnten *Rhodomyces*-Arten *Rh. Kochii* v. Wettstein 1885 und *Rh. dendrorrhous* Ludwig 1891 trotz der nicht vollständigen Beschreibung (Angaben über Kultureigenschaften und Assimilation fehlen) in den Kreis der seit *Kluyver* und *van Niel* 1924 als *Sporobolomyces* bezeichneten Pilze gehören. Da Originalkulturen der *Rhodomyces*-Arten nicht vorhanden sind, kann dieser Beweis nicht schlüssig geführt werden. Immerhin müßte bei einer späteren Bearbeitung der *Sporobolomyces*-Arten die Anerkennung des Gattungsnamens *Rhodomyces* in Erwägung gezogen werden, da er die Priorität vor *Sporobolomyces* hat.

Eigene Untersuchungen des vorliegenden Pilzes ergaben Folgendes:

In Würze bei 30° C nach 3 Tagen: Geschlossene, anfangs weiße Decke mit leichtem Stich ins Rosa, glatt, mit beginnender Faltung, Fältchen rosa. 5 mm hoher Ring, zunächst kein Bodensatz, Lösung leicht trüb. Später wird die Decke immer dicker, erst rosa, dann lachsfarben, wenig glänzend oder matt bis bestäubt, in letzterem Fall ungleichfarbig: stellenweise fast weiß (bestäubt), ndernorts lachs oder rosa in verschiedenen Schattierungen.

¹ Die Untersuchungen wurden im Laufe der letzten 10 Jahre bei der Firma Technisches Büro Percola GmbH, München, der Wissenschaftlichen Station für Brauerei in München, dem Gärungsphysiologischen Institut der Technischen Hochschule München in Weihenstephan und der Firma WIRAG, Gesellschaft für wissenschaftliche und technische Chemie in München durchgeführt.

Decke schließlich käsig dick, oberseits weiterwachsend, untere Teile unter-sinkend. Dadurch kommt Bodensatz zustande, der langsam zunimmt. Bodensatz lachsfarben. Lösung stark trüb. Decke aderig gewellt bis faltig gekräuselt. — Im mikroskopischen Bild sieht man Sporen, die sprossen oder zu wurmartig gekrümmten oder geschlängelten Hyphenzellen auswachsen. Z. T. Bildung von Sekundärsporen, die auf haarfein ausgezogenen Sterigmen aufsitzen. Sporen typisch mit einer fast geraden und einer stark konvexen Seite, beidendig abgestutzt, Größe $2,8-4,2 \times 7-11 \mu$. (Die Frage, ob es sich um Sporen [Basidiosporen] oder Konidien handelt, ist umstritten. Für die Auffassung als Basidiosporen haben sich KLUYVER und VAN NIEL 1924 und 1927, später DERY 1930 und BULLER 1933 ausgesprochen, sie rechnen die Gattung *Sporobolomyces* zu den *Hemibasidieen*. Nach LOHWAG 1925, GUILLIERMOND 1926 und STEMPALT 1935 handelt es sich dagegen um Konidien.)

In $\frac{3}{4}$, $\frac{1}{2}$ und $\frac{1}{4}$ verdünnter Würze ist die Entwicklung des Pilzes grundsätzlich gleich, nur kommt die Form II von DERY noch ausgesprochener zur Ausbildung: Verschiedenfarbige Inseln, die mit abnehmender Würzekonzentration immer langsamer zusammenwachsen. Die Decke sieht schuppig aus. In dunkler rosa Schuppen starke Myzelbildung. Einzelhyphen z. T. sehr dick, lang und starr und angefüllt mit regelmäßigen Fetttropfen, die manchmal Endokonidienbildung vortäuschen können.

Riesenkolonie auf Würzeagar nach 7 Wochen: Kolonie ziegelbis lachsrot, zum Rande hin himbeerrosa, in der Mitte hoch grobfaltig, nach dem Rande zu feinfaltig. Falten teils mehr konzentrisch, teils radial gefaltet. Rand wenig gekerbt, Lappen groß, in sich glattrandig. Mitunter graurosa Sektoren, die stark weiß bestäubt sind. Mitte auch weiß bestäubt. Kolonie matt und trocken.

Wie man sieht, entwickelt der extrem aerophile Pilz auf Flüssigkeiten eine Vegetation, die mit zunehmendem Alter seinen Kolonien auf festen Nährböden immer ähnlicher wird.

Gärfähigkeit: fehlt.

Die Assimilation von Zuckerarten und Stickstoffverbindungen wurde nach der auxanographischen Methode nach LODDER-BELJERINCK geprüft. Der Pilz assimiliert von Zuckern nur Monosen (Dextrose, Lävulose, Mannose und Xylose), von Stickstoffverbindungen gut Ammonsulfat, Pepton, Kaliumnitrat, Harnstoff und Asparagin, schwächer Glykokoll und nur sehr schwach Tryptophan. — Geprüft und als nicht assimilierbar befunden wurden von Zuckern Galaktose, Saccharose, Laktose, Maltöse, Raffinose, Arabinose und Rhamnose, von Stickstoffverbindungen nur Histidin. In den Stickstoffauxanogrammen fiel ein starker, leichenartiger Geruch auf.

Wie aus dieser Beschreibung hervorgeht, handelt es sich um eine Form, die der Art *Sporobolomyces salmonicolor* nahe steht, indem sie auf Würze sofort eine Haut bildet, Nitrat assimilieren kann und stark entwickeltes Pseudomyzel und Myzel aufweist. Der vorliegende Stamm unterscheidet sich aber von *Sp. salmonicolor*, indem er nur Monosen (Dextrose, Lävulose, Mannose, Xylose) assimilieren kann und nicht die andern Zucker. Dieser Stamm ist durch jahrelange Kultur auf festen Nährböden in die Form II nach DERY übergegangen, was vor allem aus der üppigen Pseudomyzelbildung und dem stellenweise auftretenden Myzel mit echten Querwänden hervorgeht. Im übrigen konnten die Beobachtungen von DERY bestätigt werden, daß es eine I. und eine II.

Form auch bei dieser *Sporobolomyces*-Art gibt, die also etwa der *S.* (*smooth*) und *R.* (*rough*) Form bei *Bakterien* (ACKWRIGHT) und ebenso bei *Hefen* (z. B. nach NYBERG) entsprechen. Der beschriebene Pilz stellt eine neue Art dar. Es sei vorgeschlagen, den Pilz zu bezeichnen als:

***Sporobolomyces holsaticus* n. sp.**

Artumgrenzung:

Langovale Zellen mit Sprossung, die oft unregelmäßig an beliebigen Stellen erfolgt, daneben mehr oder weniger Pseudomyzel und selten auch starr gerades Myzel. Zellen oft knorrig gekrümmt und verbogen. Sporen (oder Konidien) ungleichseitig konvex, beidendig abgestutzt, $2,8-4,2 \times 7-11 \mu$. Riesenkolonie auf Würzeagar ziegel- bis lachsrot, am Rande himbeerrosa; in der Mitte grobfaltig, nach außen feiner gefaltet. Rand wenig gekerbt, Lappen glattrandig und groß. Mitte der Kolonie weiß bestäubt, Kolonie matt und trocken. (Form 2 nach DEX). In Würze sofort geschlossene, anfangs weiße, dann rosarote Decke, die sich allmählich faltet. Ring und später lachsrosa Bodensatz. Gärung fehlt. In synthetischen Medien Wachstum nur mit Monosen (Dextrose, Lävulose, Mannose und Xylose). Von den untersuchten Stickstoffverbindungen werden Ammonsulfat, Pepton, Kaliumnitrat, Harnstoff und Asparagin gut, schwächer Glykokoll und sehr schwach Tryptophan assimiliert.



Abb. 1. *Sporobolomyces holsaticus* n. sp. Riesenkolonie nach 7 Wochen auf Würzeagar in Kolleflasche. Mitte der Kolonie ziegel- bis lachsrot, zum Rande hin himbeerrosa, mit 2 weißlich-graurosa Sektoren. Nat. Größe.

Literatur.

ACKWRIGHT: zitiert nach Nyberg. — A. H. R. BULLER: Res. on Fungi **5**, 171, (1933). — R. CIFERRI u. P. REDAELLI: Ann. Mycol. **27**, 243, (1929). — R. CIFERRI u. O. VERONA: Mycopathologia **1**, 1938. — E. G. DERX: Ann. Mycol. **28**, 1, (1930). — A. GUILLIERMOND: Bull. soc. myc. France **43**, 245 (1927). — A. J. KLUYVER u. C. B. VAN NIEL: Zbl. Bakt. II **63**, 1, (1924). — A. J. KLUYVER u. C. B. VAN NIEL: Ann. Mycol. **25**, 384, (1927). — H. LOWAG: Ann. Mycol. **24**, (1926.) — F. LUDWIG: Zbl. f. Bakt. II **10**, 10, (1891). — K. STEMPALT: Ztschr. f. Bot. **28**, 225, (1935). — F. VON WETTSTEIN: Sitzber. Kais. Akad. Wiss. Wien **5**, 2, (1885). — C. Nyberg: Zbl. f. Bakt. II **103**, 272 (1941) und **105**, 241 (1942).

(Aus dem Laboratorium für Mikrobiologie, Mahlum bei (20) Böckenem.)

Untersuchungen zur Erdölbakteriologie I.

Von

ADELHEID MÜLLER und W. SCHWARTZ.

(Eingegangen am 27. Januar 1948.)

Seit etwa 20 Jahren hat sich eine Mikrobiologie des Erdöls und der Erdölprodukte entwickelt, eingeleitet durch die um 1924 begonnenen Untersuchungen von GINSBURG-KARAGITSCHewa (1926, 1927) auf den Ölfeldern von Apsheron und durch die Entdeckung lebender Bakterien im Erdöl und in dem das Öl begleitenden salzhaltigen Ölwasser¹.

Zunächst handelte es sich nur um *desulfurizierende Bakterien*, später stellte sich heraus, daß eine charakteristische, vorwiegend aus *Bakterien*, zusammengesetzte Mikroflora an das Erdöl gebunden ist. Fast gleichzeitig haben in den Vereinigten Staaten BASTIN und seine Mitarbeiter (1926, 1930), GAHL und ANDERSON (1928), GINTER (1930) *desulfurizierende Bakterien* im Erdöl nachgewiesen. Auch von ihnen wird das fast völlige Fehlen von Sulfaten im Ölwasser und das Auftreten von Schwefelwasserstoff in Erdölgasen mit der Lebenstätigkeit dieser Bakterien in Verbindung gebracht, da die Bedingungen zu einer chemischen Reduktion der Sulfate in der Lagerstätte nicht gegeben sind (BASTIN usw. 1926 b).

In der weiteren Entwicklung lag die Führung zunächst bei russischen Forschern, besonders bei GINSBURG-KARAGITSCHewa und TAUSSON. Die Bakterienflora des Erdöls erwies sich als recht mannigfaltig. Außer *Vibrio desulfuricans* fanden sich Bakterien, die aus schwefelhaltigen Proteinen Schwefelwasserstoff und Merkaptan abspalten, *Denitrifizierer*, *Wasserstoffgärer*, *Methangärer*, *Zellulosevergärer*. (GINSBURG-KARAGITSCHewa 1933). Eine ähnlich zusammengesetzte Mikroflora wurde in bituminösen Tiefseeablagerungen des Schwarzen Meeres (GINSBURG-KARAGITSCHewa 1934, 1935) und im Schlamm der in Erdölgebieten vorkommenden Schlammvulkane oder Salsen (TAUSSON 1934, RUBENTSCHIK, 1936) entdeckt.

Die Herkunft der im Erdöl und Ölwasser bei ihrem Austritt aus den Erdölsonden ermittelten Keime soll nach Ansicht der amerikanischen und russischen Forscher in der Lagerstätte selbst zu suchen sein. Da die Probenahmen an der Erdoberfläche erfolgten, sind die Beweise hierfür indirekter Natur. GAHL und ANDERSON (1928) verweisen auf die Beziehungen zwischen Salztoleranz und Temperatursprüchen der von ihnen isolierten Rassen des *Vibrio desulfuricans* einerseits und den in den betreffenden Lagerstätten nach Salzgehalt des Ölwassers und Tiefenanlage gegebenen Bedingungen andererseits. GINSBURG-KARAGITSCHewa (1937) untersuchte einen frischen Aufschluß einer Ölschicht mit Gasauftrieb und eruptivem Ölaustritt. Sie fand *desulfurizierende Bakterien* nur in dem mit dem Öl in Kontakt stehenden Öl-

¹ Vgl. hierzu auch SCHWARTZ u. MÜLLER (1948).

wasser, während der zuerst ausgeschleuderte Bohrschlamm keine enthielt. Der Keimgehalt des Öl-Wasser-Gemisches stieg vom ersten zum fünften Tag der Eruption von 2,5 auf 6,9 Millionen Bakterien an, beides Stützen für die Annahme, daß die Bakterien nicht erst während des Bohrprozesses in die Bohrung eingeschleppt worden waren.

Die Folgerungen, die GINSBURG-KARAGITSCHewa (1933) aus ihren Funden gezogen hat, sind sehr weitgehend: Die heute im Erdöl vorhandenen Keime sollen Nachkommen der Mikroben sein, die an der Entstehung des Orbitumens aus sapropelartigen marinen Ablagerungen beteiligt waren. Sie sollen an der sich über Jahrtausende hinziehenden Umwandlung der Ausgangssedimente zum Orbitumen und zum Erdöl und an dessen Wanderungen zur heutigen Lagerstätte teilgenommen haben.

Daß tatsächlich Erdölbestandteile als Nährstoffe verwandt werden können, geht z. B. aus Untersuchungen von TAUSSON und SHAPIRO (1934) über die Oxydation von Emba-Rohöl und Baku-Schmieröl hervor, von denen im Verlauf von 7 Monaten 45 bzw. 12% oxydiert worden waren. TAUSSON hatte schon früher die Oxydation von Paraffin (1925), Naphthalin (1927), Phenanthren (1928) und von verschiedenen anderen Kohlenwasserstoffen wie Toluol, Xylol, Cymol, Stilben (1929) nachgewiesen. Die wirksamen Bakterien stammten aus Erdöl und aus öldurchtränkten Bodenproben von Ölfeldern. Die Diagnose der neu beschriebenen Arten ist leider nirgends so vollständig, daß es möglich wäre, zu entscheiden, ob es sich wirklich um neue Arten handelt oder um andere längst bekannte, die unter anderem auch Kohlenwasserstoffe angreifen können. Auch über die Art der Verwendung der Kohlenwasserstoffe im Bau- und Betriebsstoffwechsel und über den Verlauf des Abbaus ist noch nichts Gesichertes bekannt. Die Tatsache, daß Kohlenwasserstoffe von einer ganzen Reihe von Mikroorganismen aus beliebigen Schlamm- und Bodenproben angegriffen werden können, ist an sich nicht neu. Soweit Kohlenwasserstoffe des Erdöls in Frage kommen, wären z. B. die Arbeiten von PETER (1919), TAU SZ (1919), TAU SZ und DONATH (1930) zu nennen.

Zahlreiche Angaben über die Oxydation der verschiedensten Kohlenwasserstoffe durch Mikroben findet man bei ZOBELL (1946). Auch in Erdölprodukten treten Bakterien auf und bewirken dort unter Umständen unerwünschte chemische Umsetzungen. So enthalten z. B. die in Maschinenfabriken bei der Metallbearbeitung benutzten Mineralölemulsionen erhebliche Bakterienmengen (LEE u. CHANDLER, 1941, DUFFETT usw., 1943, ERNST, 1943); Gasbildungen in Petroleumtanks können bakteriell bedingt sein (THAYSEN 1939, 1940); Flugzeug-Gasolin ändert bei der Lagerung in Tanks unter Wasserabschluß durch Bakterientätigkeit seine chemische Zusammensetzung (ZOBELL 1945).

In Deutschland hatte LIESKE (1933) in seinem Referat über eine Arbeit von THORPE mitgeteilt, daß er in Rohölproben aus dem Hannoverschen Gebiet, die direkt aus dem aus etwa 900 m Tiefe stammenden Öl entnommen worden waren, zahlreiche Bakterien nachweisen konnte. Einige Jahre später ließ KREJCI-GRAF durch BAIER (1937) Untersuchungen auf dem Ölfeld Nienhagen durchführen. BAIER kannte offenbar einen Teil der russischen Arbeiten und die Notiz LIESKES nicht. Es gelang ihm weder mikroskopisch noch kulturell in verschiedenen Nährmedien im Erdöl Mikroorganismen nachzuweisen. Er rechnete anscheinend auch nicht

sonderlich mit ihrem Vorhandensein wegen der bekannten bakteriziden Wirkung niedrig siedender Kohlenwasserstoffe.

Mit dieser einen negativen Feststellung wurde die bakteriologische Erforschung des Erdöls in Deutschland abgetan; weitere Nachprüfungen unterblieben. Dagegen wies REJNFELD (1939), ohne seinerseits von BAIERS negativen Befunden Notiz zu nehmen, erneut in Erdölproben und begleitendem Ölwasser Bakterien nach und bestätigte damit alle früheren positiven Ergebnisse. Es läßt sich nun nicht ohne weiteres annehmen, daß die negativen Ergebnisse BAIERS gegenüber den vielen, stets positiven Ergebnissen der amerikanischen und russischen Forscher falsch sein müssen. Es könnten beispielsweise Unterschiede in den bakteriologischen Befunden in der Zusammensetzung und Herkunft der verschiedenen Ölproben begründet sein.

Als erste Aufgabe ergab sich daher, noch einmal Erdöle möglichst verschiedener Herkunft und Beschaffenheit vergleichend bakteriologisch zu untersuchen und festzustellen, ob sie keimhaltig sind oder nicht und ob sich etwa vorhandene Keime im Erdöl vermehren und Erdöl-Bestandteile verwerten können. Gegebenenfalls war die Herkunft der Keime festzustellen und abzuwägen, was für ihr primäres Vorhandensein in der Lagerstätte und was etwa für eine sekundäre Einwanderung in das Erdöl sprechen könnte. Dagegen sollte die systematische Bearbeitung isolierter Bakterien und die eingehende Untersuchung ihrer Stoffwechselphysiologie zurückgestellt werden.

Ein weiteres wichtiges Problem schien uns die Frage nach der allgemeinen Verbreitung von Erdölbakterien in der Natur zu sein, besonders in oberflächlichen Bodenschichten oberhalb und außerhalb von Erdöllagerstätten. Über die hierüber bereits durchgeführten umfangreichen Untersuchungen und ihre praktische Bedeutung soll später berichtet werden. Die Untersuchungen wurden in den Jahren 1943/44 im Botanisch-Mikrobiologischen Institut der technischen Hochschule Karlsruhe ausgeführt.

I. Bakteriologische Untersuchung von Erdölen.

1. Methode:

Wenn nachgewiesen werden soll, daß Erdöl lebende Keime beim Hochsteigen aus der Lagerstätte mit sich führt, so müssen bei der Probenahme unbedingt die Regeln der Asepsis eingehalten werden, um sekundäre Infektionen zu verhüten.

Handelt es sich jedoch nur darum, zu untersuchen, wie die im Erdöl vorhandenen Keime, gleichgültig ob sie im Öl bereits enthalten waren oder erst im Kontakt mit der Luft oder den obersten Bodenschichten aufgenommen wurden, die einzelnen Erdölbestandteile, z. B. bestimmte Kohlenwasserstoffe, abbauen, so spielt dieser Gesichtspunkt naturgemäß keine Rolle. Leider finden wir in den uns zugängigen russischen Arbeiten, die das Hochsteigen der Keime mit dem Erdöl nachweisen wollen, keine oder nur unbestimmte Angaben über die Einhaltung der Asepsis. BASTIN fing die Ölproben am Sondenkopf in sterilen Glasstopfenflaschen auf. BAIER sagt nur, daß die Probenahme unter sterilen Kautelen erfolgte.

Wir gingen, wenn irgend möglich, von der fließenden Sonde aus und griffen nur in besonderen Fällen und zu Vergleichszwecken auf das Erdöl der Sammelleitungen und der Tanks zurück, in denen sich das Öl verschiedener Sonden vermischt. Eine trocken sterilisierte, sorgfältig verpackte Glasstopfenflasche oder ein größeres Präparatenglas mit Glas- oder Korkstopfen diente zum Auffangen des Öls aus der Sonde oder aus einem Hahn der Sammelleitung. Stets ließen wir erst eine Weile das Öl frei ausfließen. Zur Entnahme aus Tanks dienten sterile Pipetten mit weiter Öffnung. Die Verarbeitung und erste Untersuchung der Proben erfolgte bei den in Deutschland genommenen Proben meist wenige Tage nach der Probenahme im Laboratorium.

a) Eine direkte mikroskopische Untersuchung im durchfallenden Licht im Deckglaspräparat war nur bei leichtflüssigen oder stärker wasserhaltigen Ölen möglich. Zähflüssige, dicke Öle ließen sich nicht genügend dünn auf Objektträgern ausstreichen.

b) Die direkte Färbung mit den üblichen Bakterienfarbstoffen gelang nicht.

c) Zum kulturellen Nachweis von Bakterien und anderen Mikroorganismen wurde ein Tropfen Erdöl auf Nähragar (hergestellt aus Fleischbouillon mit einem Zusatz von 0,5% Witte-Pepton und 0,5% NaCl) oder einem synthetischen Agarnährboden ohne C-Quelle von folgender Zusammensetzung mit dem gebogenen Glasstab ausgestrichen: NH_4Cl 0,05%, K_2HPO_4 0,05%, MgSO_4 0,02%, CaCO_3 0,02%, sorgfältig ausgewaschenes Agar 1,5%. Von diesen Platten ließen sich einzelne Kolonien abimpfen und weiter kultivieren. Auch die von BAIER benutzten Substrate wie Nährbouillon, Magermilch und synthetische Nährlösungen wurden zum Nachweis oder zur Isolierung von Keimen herangezogen, erwiesen sich jedoch als weniger brauchbar.

d) Keimgehaltsbestimmungen nach der Kochschen Plattenmethode stießen auf erhebliche Schwierigkeiten, soweit mehr als eine angenäherte Schätzung des Keimgehaltes erreicht werden sollte: 1 ccm Erdöl wurde in 99 ccm sterilem Wasser in einer mit Gummistopfen verschlossenen Rollflasche 30 Minuten lang in der Schüttelmaschine kräftig geschüttelt. Eine Emulgierung des Öls gelang jedoch nur unbefriedigend. Von der Aufschwemmung wurden Verdünnungen bis 1:10⁶ hergestellt, die sich zum Teil nur ungenügend mit dem Nährboden mischten, sodaß viele Platten wegen der lokalen Häufung von Kolonien nicht ausgewertet werden konnten. Um diese Schwierigkeiten umgehen zu können, müßte man einen geeigneten Emulgator finden, der gute Öl-in-Wasser-Emulsionen herstellt, nicht bakterizid wirkt und selbst keimfrei ist. Leider erwies sich keiner der bisher geprüften Emulgatoren als geeignet.

e) Für den Nachweis spezifischer Keime standen eine ganze Reihe von Wegen und Möglichkeiten zur Verfügung. Wir beschränkten uns zunächst auf den Nachweis von *Sulfatreduzierern*, *Denitrifizierern*, *Kohlenwasserstoffspalter* und nicht spezialisierten *Anaerobiern*. Die angewandten Methoden waren folgende:

Sulfatreduzierende Bakterien wurden nachgewiesen mit van Deldens Nährlösung unter Zusatz von 3% NaCl bei Kultur-Temperaturen von 30 und 55° C, *denitrifizierende Bakterien* mit Giltay-Lösung bei 30° C. Von *Kohlenwasserstoffspalter* wurden Paraffinspalter mit Söhngen-Lösung (modifiziert nach v. PLOTHO) bei 30° C nachgewiesen; Hexan- und Cyclohexanspalter ebenfalls bei 30° C mit folgender Nährlösung nach TAUSSON (1925): $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,1%, KNO_3 0,025%, KH_2PO_4 0,025%, MgSO_4

0,025 %, $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 0,0025\%$ + 0,2 % eines Hexan-Cyclohexangemisches (1:1). Da sich verschiedene reine Kohlenwasserstoffe als keimhaltig erwiesen, wie eine Kontrolle (Einsaat in Fleischbouillon) zeigte, mußten sie vor der Verwendung im Rückflußkühler gekocht, oder besser unter Benutzung eines Ganzglasbakterienfilters der Firma Schott keimfrei filtriert oder in einer geeigneten Glasapparatur, ähnlich der von TAUSSON (1929) angegebenen, destilliert und keimfrei aufgefangen werden.

Anaerobier wurden nachgewiesen mit frisch bereiteter Leberbouillon.

2. Ergebnisse:

Unsere Untersuchungen erstreckten sich auf 43 Erdölproben vom westlichen Flügel des Maikoper Gebietes auf der Taman Halbinsel (6), aus Weingarten in Baden (6), Nienhagen, Mölme, Rietze auf den Hannoverschen Ölfeldern (23), Pechelbronn im Elsaß (4) und Heide in Holstein (4). Nach ihrer geologischen Herkunft, ihrem Wassergehalt, ihren chemischen und physikalisch-chemischen Daten waren die Proben von ganz verschiedener Beschaffenheit, wie die folgende Übersicht zeigt (Tab. I).

Keimgehalt: Schon die mikroskopische Untersuchung ließ in einem Teil der Proben die Gegenwart von Bakterien erkennen, die sich, wenn das Öl Wasser enthielt, sehr häufig in den winzigen Wassertropfchen angesammelt hatten. In stärker wasserhaltigen Ölen waren in der Wasserschicht, die sich im Aufbewahrungsgefäß unterhalb des Öles absondert, stets größere Mengen von Bakterien enthalten.

Auch in den Ausstrichen auf festen Naturböden kam es stets zu einer mehr oder weniger reichen Entwicklung von Bakterien, auf Nähragarplatten stärker als auf synthetischem Agar. Auf Nähragar waren die Kolonien meist über die ganze Platte verstreut, sie fanden sich in dicken Ölschichten wie auch an Stellen, wo nur eine feine Ölhaut über dem Nährsubstrat lag. Auf synthetischem Agar kamen dagegen die Kolonien ausschließlich im dicker aufgestrichenen Erdöl oder am Rande von Öltropfen zur Entwicklung. Die Bakterien müssen demnach Erdölbestandteile als einzige Kohlenstoff-Quelle verwerten können.

Mit Hilfe des Koch'schen Plattenverfahrens gelang es, von den Ölausstrichen eine ganze Reihe von Bakterienstämmen zu isolieren, deren systematische Bearbeitung noch nicht abgeschlossen ist. Soweit sich bis jetzt erkennen läßt, ist vor allem die *fluorescens-pyocyanea*-Gruppe unter den auf Nähragar aerob wachsenden Erdölbakterien vertreten.

Ausstriche auf Würze-Agar-Platten blieben meist steril. In einzelnen Fällen zeigten sich jedoch *Pilze*, darunter zwei *Hefen*, (*Rhodotorula mucilaginosa* (Jörg.) Harrison und *Torulopsis albida* (Saito) Lodder, ferner *Cephalosporium acremonium* Cda, *Paecilomyces varioti* Bain., und *Tritirachium roseum* v. Beyma².

In den Ausstrichen auf Nähragar war festgestellt worden, daß keines der untersuchten Erdöle steril ist. Aus einem Überblick über die mit

² Für die Bestimmung der Kulturen danken wir dem Centralbüro für Pilzkulturen in Baarn, Holland.

Tab. I. *Geologische und chemische Daten*

Bezeichnung	Feld und Sonde	Geologische Formation und Tiefe	Ort der Probe-entnahme
R 1	Maikop	Sarmat. Schichten	tropfende Sonde
R 2	Maikop	Sarmat. Schichten	Öltümpel
R 3	Maikop Melichowski 9	Sarmat. Schichten	Sonde
R 4	Maikop Melichowski 13	Sarmat. Schichten	Sonde
R 5	Maikop Kesslerowo 58	Sarmat. Schichten	Tank
R 6	Maikop Kesslerowo 1	Sarmat. Schichten	Öltümpel
P 1	Kutzenhausen 4311	Dolom. Zone (= Obereozän bis Unter- oligozän)	Sonde
P 2	Kutzenhausen 4233		Sonde
P 3	Heidenbösch 4283		Sonde
P 4	Heidenbösch 4063		Sonde
W 1	Weingarten WD 7	Pechelbronner Sch. 408—418 m	Sonde
W 2	Weingarten WD 7a	Melettaschichten 212—233 m	Sonde
W 3	Weingarten WD 111	Pechelbronner Sch. 404—427 m	Sonde
W 4	Weingarten WD 24a	Niederrödener Sch. 78 u. 83 m	Öltümpel
W 5	Weingarten WD 24a	Niederrödener Sch. 78 u. 83 m	Sonde
W 6	Weingarten D 57	Melettaschichten 465—482 m	Sonde
Ho 67	Holstein 67	Präneokome Schuttbildung ohne Zechstein 835 m	Sonde
Ho 74	Holstein 74	Unterer und mittlerer Zech- stein 840 m	Sonde
Me 21	Meldorf 21	Präneokome Schuttbldg. mit Zechstein 1105 m	Sonde
Me 29	Meldorf 29	ebenso 1035 m	Sonde
H 1	Rietze Greiser 89	oberes Unteralt. aus Ton- eisensteinknollen	Sonde
H 2	Nienhagen E 114	Val. 1020—1026,7 m Weald. 1028,8—1035,4 m Cornbrash 1044,4—1060,4 m	Sonde
H 3	Wienhausen 16	Fuhse-Schichten 1144—1150 m	Sonde
H 4	Wachtel 109	Fuhse Schichten 477—486 m	Sonde
H 5	Wachtel 35	Rät u. Lias α 1161 m	Sonde
H 6	Eicklingen 4		Sonde
H 7	Wachtel 5		Sonde

über die untersuchten Erdölproben.

Bezeichnung	Wassergehalt	Paraffingehalt	Schwefelgehalt	spez. Gew.	Bemerkungen
R 1	gering	—	—	—	Chemische Untersuchungen konnten wegen der geringen Menge des Materials nicht durchgeführt werden
R 2	etwa 80%	—	—	—	
R 3	gering	—	—	—	
R 4	—	—	—	—	
R 5	Spuren	—	—	—	
R 6	—	—	—	—	
P 1	21%	4,4%	0,74%	0,899	458 m (Tiefe)
P 2	11,5%	6,0%	0,56%	0,877	478—507 m (mehrere Lager)
P 3	7%	3,6%	0,77%	0,884	565 m
P 4	6%	4,7%	0,85%	0,891	552 m
W 1	1,5%	—	—	0,885	Daten über Wassergehalt und spez. Gew. vom Febr. 1944
W 2	1,0%	—	—	0,882	
W 3	0,5%	—	—	0,881	
W 4	20%	—	—	0,930	Sonde WD 24a fördert nur zeitweise Öl (W4), sonst nur Ölwasser (W5)
W 5	100%	—	—	—	
W 6	1,0%	—	—	0,885	
Ho 67	0,3— 15,6%	3,14%	0,49%	0,855	Gasbildung (Methan u. Stickstoff)
Ho 74	0,4— 6,4%	3,88%	0,82%	0,860	ebenso
Me 21	0,3%	3,83%	1,0%	0,858	
Me 29	0,4%	3,80%	1,17%	0,869	
H 1	0%	11,04%	0,25%	0,844	dünnflüssig, hellgrün
H 2	Spuren	7,70%	0,57%	0,885	zäh
H 3	Spuren	6,82%	0,62%	0,866	dünnflüssig
H 4	50,0%	5,47%	0,35%	0,879	
H 5	4,8%	7,22%	0,48%	0,867	
H 6	0,15%	4,74%	0,62%	0,859	dünnflüssig, stark merkaptanhaltig
H 7	8,0%	8,87%	0,45%	0,874	Ölwasser mit Ölspuren

Fortsetzung Tabelle 1.

Bezeichnung	Feld und Sonde	Geologische Formation und Tiefe	Ort der Probeentnahme
H 8	Wachtel 117	Korallenoolith 298—308 m	Sonde
H 9	Feldbergen 11	Korallenoolith 368—375,5 m	Tank
H 10	Feldbergen 9	Fuhse-Sch. + Korallenool. 331—347 m	Tank
H 11	Nienhagen E 110	Valendis 745—768,5 m	Sonde
H 12	Wachtel 33	Rät 147 m	Sonde
H 13	Nienhagen E 57	Val. 1122,8—1138,7 m Macrocephalen-Sch. bis 1139,3 m	Sonde
H 14	Froehlich 5	Wealden 1471—1501 m	Sonde
H 15	Froehlich 38	Wealden 1551—1558 m	Sonde
H 16	Eicklingen 15	Val. + Weald. 612—723 m	Sonde
H 17	Nienhagen E 189	Valendis 212,5—237 m	Sonde
H 18	Froehlich 5	Wealden 1471—1591 m	Sonde
H 19	Büthenhorst 1	Wealden 1525—1530,4 m	Sonde
H 20	Froehlich 33	Wealden 1427—1441,5 m	Sonde
H 21	Wachtel 126	Fuhse-Sch. 532—545 m	Sonde
H 22	Wachtel 124	Fuhse-Sch. 529—541,5 m	Tank
H 23	Wachtel 101	Fuhse-Sch. 479—503 m	Sonde

einzelnen Ölen durchgeführten Keimzahlbestimmungen geht hervor, daß der Keimgehalt verschiedener Öle unterschiedlich ist (Tab. II). Die höchsten Keimzahlen wiesen die Maikoper Ölproben auf, die aber nicht aus Sonden selbst sondern aus Sammelbehältern entnommen worden waren, so daß die Möglichkeit einer zusätzlichen Infektion besteht. Bei längerer Aufbewahrung im Laboratorium kann der Keimgehalt allmählich abnehmen. Wie weit etwa Beziehungen zwischen Keimgehalt und Tiefenlage bzw. Wassergehalt der Ölproben bestehen, läßt sich noch nicht entscheiden. Zu diesem Zweck wäre es erforderlich, eine erheblich größere Anzahl von Bestimmungen durchzuführen. — Interessant ist das Ergebnis von H 18. Es handelt sich um eine Sonde, deren Öl sich bei BAIER (1937) als keimfrei erwiesen hatte. Jetzt fördert die Sonde allerdings nur noch Ölwasser mit Ölspuren, das in unserer Bestimmung bis zu 4000 Keimen je ccm enthielt.

Nachweis spezifischer Keime:

Sulfatreduzierende Bakterien traten in 10 der untersuchten Ölproben auf. Positiv waren 2 russische Ölproben (R 2 und R 5), 6 weingartener (W 1—6) und 2 hannoversche (H 4 und H 17). Die Keime ent-

Fortsetzung Tabelle 1.

Bezeichnung	Wassergehalt	Paraffingehalt	Schwefelgehalt	spez. Gew.	Bemerkungen
H 8	0,15%	3,82%	0,64%	0,879	
H 9	0%	3,92%	0,64%	0,868	
H 10	0%	4,12%	0,73%	0,864	
H 11	56,0%	6,20%	0,68%	0,948	äußerst zäh
H 12	0,8%	9,62%	0,61%	0,862	Ölwasser mit Ölspuren
H 13	0,9%	7,90%	0,66%	0,893	
H 14	10,0%	3,98%	0,85%	0,868	
H 15	—	—	—	—	
H 16	0,35%	5,67%	0,65%	0,861	merkaptanhaltig
H 17	—	—	—	0,923	
H 18	—	—	—	—	vgl. H 14, jedoch Salzwasser mit Eisenspuren
H 19	0%	4,43%	0,91%	0,865	
H 20	0%	4,25%	0,49%	0,865	
H 21	Spuren	6,88%	0,51%	0,856	
H 22	Spuren	10,35%	0,58%	0,857	
H 23	1,6%	6,88%	0,40%	0,873	

wickelten sich ausschließlich bei 30° C und ließen sich auf Subkulturen übertragen. Sämtliche Kulturen bei 55° C blieben steril. Nach dem mikroskopischen Bild dürfte der Organismus mit *Vibrio (Microspira) desulfuricans* identisch sein. Sporenbildung wurde bei 30° C nicht beobachtet. Weiterhin versuchten wir, die isolierten Vibrionen auf der gleichen Nährlösung (VAN DELDEN), jedoch mit reinen, entkeimten Kohlenwasserstoffen wie Hexan, Cyklohexan, Heptan als C-Quelle zu kultivieren. Die modifizierte Nährlösung hatte folgende Zusammensetzung: Aqu. dest. (dopp. dest.) 100 cem, K_2HSO_4 0,05%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,1%, $(NH_4)_2SO_4$ 0,1%, NaCl 3,0%, $FeSO_4$ Spur, Kohlenwasserstoff³ 0,1%. Durch TAUSSON und VESSELOW (1934) war nachgewiesen worden, daß *sulfatreduzierende Bakterien* viele Verbindungen der aliphatischen Reihe (Salze der niederen Fettsäuren, der Oxysäuren, Asparagin, Fette, höhere Paraffin-Kohlenwasserstoffe, z. B. Wachs und einige Kohlenwasserstoffe des natürlichen Erdöls) als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle verwerten können. Wir stellten fest, daß auch Hexan und Cyklohexan von diesen Bakterien verwendet werden können, allerdings nur in

³⁾ sterilisiert durch Destillation.

Tab. II. Keimgehalt verschiedener Erdölproben.

Bezeichnung der Probe	Feld und Sonde	Ort der Probenahme	Zeitpunkt der Bestimmung nach Probenahme	Keimzahl ccm
R 5	Maikop Kesslerowa 1	Tank	3 Monate	$1,3-3,5 \times 10^6$
R 5	Maikop Kesslerowa 1	Tank	10 Monate	$1,2 \times 10^5$
R 6	Maikop Kesslerowa 58	Öltümpel	3 Monate	$1,0 \times 10^5$
W 2	Weingarten WD 7a	Sonde	10 Wochen	$8,0-10,0 \times 10^4$
H 1	Rietze Greiser 89	Sonde	4 Wochen	bis $6,0 \times 10^4$
H 16	Eicklingen 15	Sonde	4 Wochen	bis $8,0 \times 10^4$
H 18	Nienhagen Fröhlich 5	Sonde mit Ölwasser	4 Wochen	bis $4,0 \times 10^4$
H 6	Eicklingen 4	Sonde	4 Wochen	bis $2,0 \times 10,4^4$

einem Fall und zwar mit den aus der Ölprobe W 1 isolierten *Sulfat-reduzierern*.

Denitrifizierende Bakterien: Da Stickstoff ein häufiger Begleiter von Erdölgasen ist, lag die Vermutung nahe, daß für seine Entstehung *Denitrifizierer* verantwortlich zu machen sind. Es gelang uns jedoch bisher im Gegensatz zu GINSBURG-KARAGITSCHewa und anderen nicht, im Erdöl Stickstoff frei machende Denitrifizierer kulturell nachzuweisen. Dies ist insofern bemerkenswert, als wir in Ölausstrichen auf Nähragar Vertreter der an der Denitrifikation beteiligten *fluorescens-pyocyanea*-Gruppe gefunden haben. In einzelnen Fällen fand wohl eine Entwicklung von Bakterien in Giltay-Lösung mit eingepfemtem Öl statt in Form von Bakterienhäuten, die wie Schleier am Öl hingen; die charakteristische Gasbildung dagegen wurde nicht beobachtet. — Bemerkenswert ist ferner, daß in 5 Fällen Veränderungen am Öl auftraten, derart, daß das Öl fester, wachsartiger wurde und schließlich in der Nährlösung zu Boden sank.

Kohlenwasserstoffspalter: Paraffinabbauende Bakterien sind im Erdöl weit verbreitet. Fast in jeder untersuchten Ölprobe waren Mikroorganismen vorhanden, die Paraffin angriffen und auch in Subkulturen wuchsen. Es handelt sich dabei zum Teil um *Mycobakterien*, jedoch traten daneben auch andere *Eubakterien* und *Pilze* auf. Die Be-

stimmung dieser Organismen, sowie die Untersuchung ihres Stoffwechsels und der chemischen Vorgänge beim Abbau des Paraffins sollen in einer späteren Arbeit behandelt werden.

Hexan-Cyclohexanspalter waren weniger weit verbreitet. In einigen Kulturen kam es zu Wachstum von *Pilzen* oder *Bakterien*. Die Entwicklung war nur gering und ging vom eingepfhten Öl aus, sodaß nicht bestimmt werden kann, ob das zugesetzte Hexan-Cyclohexan-Gemisch oder irgendwelche Erdölkomponenten als C-Quelle dienen.

Dagegen waren *Anaerobier* wieder häufiger. Eine Reihe der untersuchten Ölproben zeigte, eingepfht in Leberbouillon und kultiviert bei 30° C, eine mit Trübung verbundene Bakterienentwicklung, die meist schon nach wenigen Tagen eintrat.

An der Tatsache, daß sich Mikroorganismen trotz des Vorhandenseins bakterizider Bestandteile im Erdöl entwickeln können, ist nicht zu zweifeln. Der größere Teil der von uns im Erdöl nachgewiesenen Mikroorganismen ist jedoch aerob, nur ein kleiner Teil verlangt anaerobe Lebensbedingungen (*Sulfatreduzierer*, *Denitrifizierer* und *Anaerobier* in Leberbouillon). Dies Ergebnis überrascht, denn es ist schwer vorstellbar, daß in den Erdöllagerstätten, die bis in etwa 2000 m Tiefe reichen, freier Sauerstoff zur Verfügung stehen soll. Außerdem ist gerade das Fehlen des Sauerstoffs ein entscheidender Faktor bei der Entstehung des Erdöls. Selbst die allgemeine Gültigkeit einer Hilshypothese wie sie ISSATSCHENKO (1940) für das Vorkommen von Sauerstoff im Untergrundwasser von Baku aufgestellt hat, würde also nur von zweifelhaftem Wert sein.

Es bleibt allerdings noch die Möglichkeit, daß ein Teil der auf Platten aerob wachsenden Bakterien sich fakultativ anaerob entwickeln kann. So haben auch LIESKE und HOFFMANN (1928) in Braun- und Steinkohlengrabenstätten aerobe Bakterien (Vertreter der *fluorescens*-, *subtilis*- und *mesentericus*-Gruppe) nachgewiesen, die sich sämtlich auch fakultativ anaerob entwickelten.

Weiterhin ergibt sich die Frage, ob die Keime, die wir in den aseptisch am Sondenkopf entnommenen Ölproben nachgewiesen haben, aus der Lagerstätte selbst stammen und nach Abschluß des Bohrprozesses mit dem Öl hochgekommen sind, wie es GINSBURG-KARAGITSCHWA (1937) und GAHL und ANDERSON (1928) annehmen.

Uns scheinen diese Feststellungen noch nicht genügend beweiskräftig zu sein, vor allem mit Rücksicht auf die unkontrollierbaren Verhältnisse bei dem sich oft über viele Monate erstreckenden Bohrprozeß. Es ist schwer, wenn nicht unmöglich, hierbei eine Einwanderung von Keimen von der Oberfläche und eine Infektion des Öles in der Lagerstätte mit völliger Sicherheit auszuschließen, denn während der Bohrung wird Bohrschlamm in ununterbrochenem Kreislauf von einer Schlammgrube in das Bohrloch gepumpt, steigt wieder hoch und fließt in die Grube zurück. Wir untersuchten den Spülschlamm aus der Bohrung Meldorf 47. Der graue, tonige Schlamm enthielt eine mannigfaltige Bakterienflora

mit einem Keimgehalt von 1×10^7 aeroben im Koch'schen Plattenverfahren auf Fleischbouillonagar nachgewiesenen Keimen.

Entscheiden läßt sich diese Frage nur, wenn eine Probenahme unmittelbar in der Lagerstätte gelingt. Die Möglichkeit hierzu ist in den Ölbergwerken in Wietze/Hannover, Pechelbronn/Elsaß und Heide/Holstein gegeben.

II. Untersuchung von Ölsand- und Ölkreideproben aus Erdölschächten.

1. Methode:

Die Art und Weise der Ölförderung und Ölgewinnung ist in den drei Bergwerken verschieden, weil die Trägersteine und ihr Ölgehalt unterschiedlich sind: in Wietze und Pechelbronn ist das Erdöl an Sande gebunden, in Heide an Kreide. Die Ölgewinnung geschieht in Pechelbronn durch Sickeranlagen, die in den Ölsand vorgetrieben werden, in Wietze durch Förderung und anschließendes Auswaschen des Ölsandes und in Heide ebenfalls durch Förderung der Ölkreide, die dann in Schwelereien entölt wird.

Wir hatten die Möglichkeit, in allen drei Ölbergwerken Proben zu nehmen. Da die Schächte in Ölfeldern liegen, die gleichzeitig durch Bohrbetrieb ausgebeutet werden, ist es unerlässlich, die Probenahme nur an Stellen vorzunehmen, in deren weiterer Umgebung sich keine Sonden befinden, um die Möglichkeit einer Infektion von außen von vornherein auszuschließen. Diese Bedingung wurde in allen Fällen erfüllt. Die Probenahme erfolgte stets vor Ort an der Stelle des Ölsand- bzw. Ölkreideabbaues und unter strengster Wahrung der Asepsis. Die Vorbereitungen wurden im Laboratorium erledigt: Bereitung der Nährsubstrate und Sterilisieren von Geräten (Glas- und Metallspatel in Reagensröhrchen) und Tüchern zum Abdecken und als Gesichtsschutz. Die sterilen Nährböden (Leberbouillon-Röhrchen, Nähragar- und Würzeagar-Schrägröhrchen, ferner Petrischalen mit Nähragar und Würzeagar mit Leukoplastverschluß für Luftanalysen) und leeren Reagensröhrchen zur Aufnahme von Proben für spätere Verarbeitung sowie sterile Geräte und Tücher wurden sorgfältig verpackt mit in das Bergwerk genommen.

Als weitere Voraussetzung für eine einwandfreie Probenahme war erforderlich, vorher die Lüftung in dem betreffenden Stollen abzustellen, da die Bergwerksluft keineswegs keimfrei ist: Luftanalysen ergaben eine ziemlich reiche *Pilz-* und *Bakterienflora*, unter den Bakterien vor allem *Fluoreszenten*.

Unmittelbar vor der Probenahme wurden an der vorgesehenen, etwa in Schulterhöhe gelegenen Stelle mindestens noch 50 cm vom anstehenden Gebirge, an dem vorher ununterbrochen abgebaut worden war, in Form eines kleinen Schachtes mit dem Preßlufthammer oder der Spitzhacke entfernt. Die frische Bruchfläche deckten wir sofort mit sterilen Tüchern ab, bis auf eine kleine Stelle, von der die Entnahme erfolgen sollte. Nach Anlegen eines Gesichtsschutzes zur Verhütung von Infektionen durch die Atemluft und nach Desinfektion der Hände mit Sublimat-Alkohol wurde zunächst noch eine weitere Schicht mit sterilen Geräten entfernt und erst dann das Einimpfen in die Nährsubstrate oder in sterile Röhrchen vorgenommen. Wir nahmen in dem leicht zu bearbeitenden Ölsand nicht nur Proben von der frischen Oberfläche, sondern entfernten tunnelartig im horizontalen Vortrieb

mit sterilen Instrumenten den Ölsand bis zu etwa 60 cm Tiefe und nahmen dabei in Abständen von etwa 20, 40 und 60 cm ebenfalls Proben. Nach jeder Probenahme wurden die Geräte gewechselt. Die Entnahme der letzten Proben (etwa bei 60 cm) erfolgte mit sterilen Gummihandschuhen. — Im Pechelbronner und Heider Schacht schnitten wir zufällig kleine Öllinsen an; von dem auslaufenden Öl nahmen wir gleichfalls Proben. Außerdem konnten wir im Heider Schacht unter allen Kautelen Ölwasser aus der Ölkreide mit 10% Salzgehalt auffangen. (Von einem unterhalb der Ölkreide liegenden Stollen war vor einigen Jahren ein Vorbohrloch in die Ölkreide getrieben worden, aus dem seither ununterbrochen im kräftigen Strahl Ölwasser abfließt.)

Die Untersuchung der Proben erfolgte 1 bis 4 Tage nach der Probenahme im Laboratorium: Wir legten Ausstriche auf Nähragarplatten an und überschichteten einen Teil der auf Nähragar geimpften Proben mit dem gleichen Nährboden zwecks Kultur in hoher Schicht zum Nachweis von Anaerobiern. Zum Nachweis spezifischer Keime impften wir Nährlösungen nach VAN DELDEN für *desulfurizierende Bakterien*, nach GILTAY für *denitrifizierende Bakterien*, nach OMELIANSKI für *Zellulosespalter*. Auf *Anaerobier* wurde außerdem im Hochvakuum, das mit einer Anaeroben-Pumpe nach PFEIFFER erzielt wurde, im Zeißlerschen Anaerobengefäß unter Verwendung von Nähragar bzw. Leber- und Fleischbouillon geprüft. Die Kulturen, sowie die direkt im Bergwerk beimpften Nährböden standen bei 30 und 50° C.

2. Ergebnisse:

Es kamen insgesamt 82 Ölsandproben, 23 Ölkreide- und 6 Ölwasserproben zur Untersuchung. Wie bei den aus Bohrlöchern stammenden Proben handelt es sich auch hier um Öle verschiedener Herkunft und chemischer Beschaffenheit (Tab. III). Sämtliche Proben verhielten sich in Bezug auf die Art der sich entwickelten Bakterien einheitlich:

In den aeroben Kulturen (Nähragar- und Würzeagar-Schrägröhrchen, Ausstriche auf Nähragarplatten, Keimzahlbestimmungen nach Koch) trat in keinem Fall Wachstum ein, alle Kulturen blieben während mehrerer Wochen bei 30 und 50° C steril. Auch die Kulturen in hoher Schicht zeigten keinerlei Bakterienentwicklung. Mit Rücksicht auf den Keimgehalt der Bergwerksluft dürfte diese Tatsache gleichzeitig ein Beweis für eine einwandfreie Durchführung der aseptischen Probenahme sein.

Dagegen verhielten sich die anaeroben Kulturen in Leberbouillon positiv: 38 Proben waren direkt vor Ort in Leberbouillon-Röhrchen eingeimpft und anschließend bei 30° C kultiviert worden. Davon zeigten 13 Kulturen (6 Wietzer, 6 Pechelbronner und 1 Heider) bereits nach wenigen Tagen mehr oder weniger starke Trübung der Leberbouillon und zum Teil Gasbildung. Mikroskopisch konnten Bakterien festgestellt werden, die auch durch Färbung nachgewiesen wurden. Von diesen Rohkulturen impften wir erneut in vorher ausgekochte Leberbouillon- und Fleischbouillon-Röhrchen ab, die im Anaerobengefäß nach Zeißler unter Hochvakuum bei 30° C kultiviert wurden. Auch hier trat die Entwicklung sehr schnell ein, dagegen blieben gleichzeitig ausgeführte Ausstriche auf Nähragarplatten und Kulturen unter aeroben

Tab. III. *Geologische und chemische Daten über die untersuchten Schachtöle.*

Schacht	Ort der Probenahme	Anzahl der Proben	Geologische Formation	Tiefe	Art des Trägergesteins	Ölgehalt des Trägergesteins	Spez. Gewicht des Öles	Wassergehalt des Öles	Paraffin-gehalt	Schwefel-gehalt des Öles
Wietze	Schindler Scholle (nach Osten) Sickeröl-vorrichtungsstrecke, 300 m vom Querschlag	38	Wealden (unterste Unterkreide)	253 m	Sande	8—10%	0,945	10—15%	0,92%	0,72%
Pechelbronn	Stollen Georg 1. Streich. N 30 m nördlich 2. Fall. N.	44	Obere Pechelbrunner Schichten (Unterli-gocæn)	92 m	Sande	bis 20%	0,953	0,6%	1,0%	0,85%
Heide	80 m Sohle 1. südl. Richtung 2. Abbaustöß 1 im Süden	5 10	Kreide (ohne tertiäre Bedeckung)	80 m						
	140 m Sohle 1. Hauptförderstrecke nach Westen 2. Hauptquerschlag, 280 m westlich des Schachtes (Ölwasser-Probe)	8 6	Kreide (mit tertiärer Bedeckung)	140 m	weiße Kreide	bis 20%	0,95—1,0	0,3—10,0%	0,5% 1,7—3,2%	

Bedingungen steril. Bemerkenswert ist bei diesen Versuchen, daß die positiven Kulturen aus dem Pechelbronner und Heider Schacht ausschließlich aus dem Bereich der kleinen Öllinsen stammen, die bei der Probenahme angeschnitten worden waren, in Wietze dagegen verteilen sie sich auf die ganze Probenserie (Oberfläche, 20, 40 und 60 cm tiefer).

Sulfatreduzierer kamen in 2 Fällen, wiederum in Proben aus dem Bereich der Pechelbronner Öllinsen, zur Entwicklung, sie wuchsen bei 30° C; bei 55° C entwickelten sie sich nicht mehr, Sporenbildung trat auch bei 30° C nicht auf.

Denitrifizierer konnten auch in den Schachtproben nicht nachgewiesen werden, dagegen gelang der Nachweis von *Cellulosespaltern* mit Omelianski-Medium in 3 Fällen: in 2 Ölsandproben aus Wietze und in einer Ölkreideprobe fand eine Entwicklung von *Cellulosespaltern* statt, was durch mikroskopische Kontrolle an der allmählichen Auflösung und am Verschwinden des der Nährlösung zugefügten Filtrierpapiers festgestellt wurde. In einer der Wietzer Cellulose-Kulturen färbte sich die Nährlösung schwach rötlich.

Wir führten die gleichen Kulturversuche mit der oben erwähnten Ölwasserprobe durch. Sowohl aerob wie anaerob entwickelten sich Bakterien. Auf Schrägagarröhrchen und in Leberbouillon fand kräftiges Wachstum statt. Außerdem ließen sich *desulfurizierende* und *denitrifizierende Bakterien* nachweisen, während *Cellulosespalter* fehlten.

III. Diskussion der Ergebnisse.

Überblicken wir die Ergebnisse, so dürfte nunmehr auf Grund der Untersuchungen von Schachtöl-Proben einwandfrei erwiesen sein, daß in Erdöllagerstätten, mindestens bis zu der von uns untersuchten Tiefe von etwa 250 m, sehr wahrscheinlich auch in größeren Tiefen eine autochthone Bakterienflora vorkommt. Diese Bakterien verhalten sich bei der Isolierung wie *obligate Anaerobier* und sind teilweise Spezialisten der *Desulfurikation* und *anaeroben Cellulosespaltung*. Die positiven Ergebnisse russischer und amerikanischer Forscher werden damit zu einem Teil bestätigt. Es muß also damit gerechnet werden, daß sich auch jetzt noch in den Erdöllagerstätten durch den Stoffwechsel dieser Bakterien bedingte chemische Umsetzungen abspielen.

Der Nachweis von Bakterien in den Lagerstätten läßt jedoch noch keine Stellungnahme zu den weitgehenden Schlüssen GINSBURG-KARAGITSCHEWAS über die Herkunft dieser Mikroben zu. Wir wissen nicht, ob sie tatsächlich direkte Nachkommen der Bakterien sind, die bei der Erdölgenese beteiligt waren oder ob sie erst später das Erdöl nach einer Periode vorübergehender Sterilität, vielleicht während der Wanderung zu seinen heutigen Lagerstätten erneut infiziert haben, oder ob schließlich die Infektion der Lagerstätte erst nach ihrer Erschließung erfolgte. Die erste, von GINSBURG-KARAGITSCHewa vertretene Ansicht würde weitgehende Konsequenzen nach sich ziehen in bezug auf die Höchsttemperaturen, denen das Erdöl bei seiner Entstehung und Wanderung ausgesetzt gewesen sein kann. Die dritte Annahme haben wir, soweit

dies überhaupt möglich war, bei der Wahl der Entnahmestellen in den Ölbergwerken auszuschließen versucht, trotzdem muß sie mit in Erwägung gezogen werden.

Das völlige Fehlen aerob wachsender Bakterien in den Schachtölen zwingt dagegen zu einer kritischen Betrachtung der Feststellungen, die am Öl der Ölsonden gemacht worden sind und verstärkt die bereits dort erwähnten Bedenken. Wir neigen trotz des in einem Fall (Ölwasser im Schacht Heide) gelungenen Nachweises von Aerobiern zu der Ansicht, daß ein erheblicher Teil der in den Sondenölen erfaßten Keime nicht zu den ursprünglichen Bewohnern der Erdöllagerstätten gehört, sondern sekundär in das Öl eingewandert ist und für die recht hohen Keimgehalte der Sondenöle, die Werte bis 10^6 je cm^3 erreichen, verantwortlich gemacht werden muß. Die Infektion dürfte mit dem Bohrprozeß verbunden sein, denn Untersuchungen am Bohrschlamm zeigten, daß dieser selbst bereits einen mannigfaltigen und hohen Keimgehalt aufweist, könnte sich jedoch auch noch während der Förderung abspielen bei Sonden, die nicht kontinuierlich fließen. Wenn unsere Annahme zutrifft, so würden wir also in den an der Erdoberfläche entnommenen Ölproben ähnliche Verhältnisse wie im Schlamm der Schlammvulkane antreffen, in denen RUBENTSCHIK (1936) ebenfalls eine allochthone neben einer aus der Tiefe aufsteigenden autochthonen Flora unterscheidet.

Zusammenfassung.

1. Aus den Erdölgebieten Maikop (Taman-Halbinsel), Weingarten, Hannover (Nienhagen, Mölme, Rietze), Pechelbronn und Heide wurden insgesamt 43 aus Erdölsonden oder Erdöltanks aseptisch entnommene Ölproben bakteriologisch untersucht.
2. In sämtlichen Proben ließen sich mikroskopisch und kulturell Mikroorganismen nachweisen und zwar gewöhnliche *Aerobier*, aerobe *Paraffinspalter*, *Anaerobier*, *Desulfurikanten*. Vereinzelt fanden sich auch *Pilze*.
3. Die Keimgehalte an gewöhnlichen *Aerobiern* (bestimmt nach KOCH auf Fleischbouillongelatine) lagen zwischen 2×10^4 und 3.5×10^6 je cm^3 .
4. Die Untersuchung von Ölsanden und Ölkreiden, die in den Erdöl-schächten Wietze, Pechelbronn und Heide unter strengster Wahrung der Asepsis entnommen worden waren, erbrachte den direkten Nachweis, daß mindestens ein Teil der in Erdölsonden gefundenen Bakterien bereits in der Lagerstätte vorhanden ist.
5. Es wurden nachgewiesen *obligate Anaerobier* in 13 von 38 in Ölschächten entnommenen Proben, *Desulfurikanten* in 2 Proben, *anaerobe Cellulosezersetzer* in 3 Proben. Der Nachweis von *Denitrifikanten* gelang nicht. Ebenso fehlten *Pilze* und *aerobe Bakterien*.
6. Dagegen waren in einer Ölwasserprobe aus dem Schacht Heide neben *obligaten Anaerobiern* und *Desulfurikanten* auch *Denitrifizierer* und *aerobe Bakterien* vorhanden.

7. Der hohe Keimgehalt der Sondenöle dürfte darauf zurückzuführen sein, daß ein Teil der im Sondenöl enthaltenen Keime sekundär in das Öl eingewandert ist, vielleicht während des Bohrprozesses durch Infektion vom Bohrschlamm aus oder während der Förderung.
8. Bohrschlammprouben enthielten eine reiche Bakterienflora. Der durch Kultur nachweisbare Keimgehalt an *Aerobiern* erreichte $1,0 \times 10^7$ Keime je cm^3 .

Literatur.

BAIER, C. R.: Bakteriologische Erdölstudien. Kieler Meeresforschungen **2**, 149—156 (1937). — BASTIN, E. S.: The problem of the natural reduction of sulphates. Bull. of the Amer. Assoc. of Petroleum Geologists **10**, 1270—1299 (1926a). — BASTIN, E. S., F. E. GREER, C. A. MERRIT and G. MOULTON, The presence of sulphate-reducing bacteria in oil field waters. Science **63**, 21—24 (1926b). BASTIN, E. S. and F. E. GREER, Additional data on sulphate-reducing bacteria in soils and waters of Illinois oil fields. Bull. of the Amer. Assoc. of Petroleum Geologists **14**, 153—159 (1930). —

DUFFETT, N. D., GOLD, S. H. and C. L. WEIRICH: Normal bacterial flora of cutting oil emulsions. J. Bact. **45**, 37—38 1943. —

ERNST, O.: Über den Bakteriengehalt technischer Schmier- und Kühlöle. Cbl. f. Bakt. usw. I. Abt. Orig. **150**, 154—160 (1943). —

GAHL, R. and B. ANDERSON: Sulphate-reducing bacteria in California oil waters. Cbl. Bakt. II, **73**, 331—338 (1928). — GINSBURG-KARAGITSCHewa, T. L.: Microbiological research in the sulphurous and salty waters of Apsheron. Azerbajdzanskoe Neftjanoe Khozjajstvo, Baku 1926 (russ.) — The formation of hydrosulphide and mercaptans by the microflora of oil and sulphurous waters of Apsheron. Ibid. Baku 1927 (russ.) — Microflora of oil waters and oilbearing formations and biochemical processes caused by it. Bull. of the Amer. Assoc. of Petroleum Geologists **17**, 52—65 (1933). — Zur Frage der Erdölentstehung (Über Mikroben aus Erdölschichten). Priroda **22**, 22—32, Leningrad (1933). — PRIANISHNIKOV N. D. und K. F. RODIONOWA, Some data on the microbiological and chemical analyses of Black-Sea deep bottom slimes. Mikrobiologie **3**, 513—522 (1934) (russ.) — und K. F. RODIONOWA, Beiträge zur Kenntnis der im Tiefseeschlamm stattfindenden biochemischen Prozesse (Zur Frage der Erdölbildung). Biochem. Zeitschr. **275**, 396—404 (1935). — Über die Ursachen des schwachen Sulfatgehaltes der Ölwasser. Petroleum **33**, 7 (1937). — GINTER, R. L.: Causative agents of sulphate reduction in oil well waters. Bull. of the Amer. Assoc. of Petroleum Geologists **14**, 139—152 1930. —

ISSATSCHENKO, V.: On the microorganisms of the lower limits of the biosphere. J. Bact. **40**, 379—381 (1940). —

LEE, M. and A. C. CHANDLER: A study of the nature, growth and control of bacteria in cutting compounds. J. Bact. **41**, 373—86 (1941). —

LIESKE, R.: Referat zu THORPE, H., Petroleumbakterien und die Ernährung von Psilopa petrolei. Nature **130**, 437 (1932). Brennstoffchemie, **14**, 16 (1933) — und H. HOFFMANN. Untersuchungen über die Mikrobiologie

der Kohlen und ihrer natürlichen Lagerstätten: 1. Die Mikroflora der Braunkohlengruben. Brennstoff-Chemie **9**, 174 (1928). — 2. Die Mikroflora der Steinkohlengruben. Jbid. **9**, 282 (1928). —

PETER, M.: Neue Methode der Kohlenwasserstoffanalyse mit Hilfe von Bakterien. Diss. Karlsruhe 1919.

REJNFELD, E. A.: Mikrobiologische Untersuchungen der Erdöl-Fontäne und des begleitenden Wassers. Aserbeidschan. Erdöl-Forschungsinstitut; Geol. Abt., 21. Lieferung, Baku 1939 (russ.). — RUBENTSHIK, L.: Contribution to the microbiology of mud of mudvolcanos. Mikrobiologie **5**, 451—64 (1936) (russ.). —

SCHWARTZ, W. u. ADELHEID MÜLLER, Erdöl u. Kohle **1**, 232—240 (1948).

TAUSSON, W. O.: Zur Frage über die Assimilation des Paraffins durch Mikroorganismen. Biochem. Zeitschr. **155**, 356—368 (1925). — Naphthalin als C-Quelle für Bakterien, Planta **4**, 214—256 (1927). — Die Oxydation des Phenanthrens durch Bakterien. Ibid **5**, 239—278 (1928). — Über die Oxydation der Benzolkohlenwasserstoffe durch Bakterien. Ibid. **7**, 735—758 (1929) — und S. L. SHAPIRO, The general trend of the process of oxydation of oil by bacteria. Mikrobiologie **3**, 79—87 (1934) (russ.) — und W. A. ALIOSCHINA, Reduktion von Sulfaten durch Bakterien in Gegenwart von Kohlenwasserstoffen. Mikrobiologie **1**, 229—261 1932 (russ.) — VESSELOV, I. J., V. J. ALESHIN und M. I. GOLDIN, The anaerob microflora of mudvulkano mud. Mikrobiologie **2**, 330—345 (1934) (russ.) — und I. J. VESSELOV, On the bacteriology of the decomposition of cyclical compounds at the reduction of sulphates. Mikrobiologie **3**, 360—369 (1934) (russ.). — Tausz, J. Über die Einwirkung von Mikroorganismen auf Roherdöle. Petroleum **14**, 553—555 1919. — und P. DONATH, Über die Oxydation des Wasserstoffs und der Kohlenwasserstoffe mittels Bakterien. Zeitschr. f. physiol. Chemie **190**, 141—168 (1930). — THAYSEN, A. C., On the gas-evolution in petrol-storage tanks caused by activity of microorganisms. — J. Inst. Petroleum Technol. **25**, 111—115 (1939). — Hydrocarbon-decomposing bacteria in a storage tank for mineral oil. Proc. Third. Intern. Congr. Microbiol. Baltimore 1940.

ZOBELL, C. E.: The role of bacteria in the formation and transformation of petroleum hydrocarbons. Science, **102**, 264—69 (1945). — Action of microorganisms on hydrocarbons. Bact. Reviews **10**, 1—48 (1946). —

(Aus dem Botanischen Institut der Landwirtschaftlichen
Hochschule Hohenheim.)

Eine Kritik der Symbiosetheorie von H. Schanderl auf Grund neuerer eigener Untersuchungen.

Von

ERWIN BURCIK.

Mit 8 Textabbildungen.

(Eingegangen am 1. Februar 1948.)

Vor mehr als acht Jahren erfolgte die erste Veröffentlichung von H. SCHANDERL (1939) über die angeblich universelle Verbreitung einer Bakteriensymbiose im Pflanzenreiche. Trotz dieser acht Jahre sind die Urteile über die aufgeworfenen Fragen auch heute noch genau so geteilt wie zu Beginn der Debatte. Von restloser Zustimmung und Hin- nahme auch sehr gewagter Behauptungen bis zur striktesten Ablehnung finden wir alle Meinungen vertreten.

Ursachen dieses Zustandes sind einerseits die widrigen Umstände der Kriegs- und Nachkriegszeit, andererseits aber auch die Tatsache, daß bis auf einige wenige Beiträge (BURCIK, 1940; K. RIPPEL, 1940; HENNIG u. VILLFORTH, 1940; SCHAEDE, 1940; STÜHRK, 1941; K. RIPPEL, 1941; MARCUS, 1942) keine experimentellen Nachprüfungen der von SCHANDERL gemachten Angaben erfolgten. Dies ist umso bedauerlicher, als SCHANDERL in einer ganzen Reihe weiterer Veröffentlichungen (1940 a, b, c, 1943, 1944; SCHANDERL u. FREI, 1940) und zuletzt (1947) monographisch immer wieder seinen Standpunkt klar- legte und neues Material zur Diskussion stellte.

Seit geraumer Zeit, vor allem seit dem Erscheinen des SCHANDERL- schen Buches (1947) begegnet man auch in weitesten Kreisen, über die engere Fachwelt hinaus, einem steigenden Interesse an diesen Fragen. Die Veröffentlichung von Ergebnissen eigener umfangreicher, in den Jahren 1942—1947 durchgeführter Untersuchungen erscheint daher ge- rade zu diesem Zeitpunkt angezeigt. Wie meine frühere Arbeit (BURCIK, 1940), befaßt sich auch diese ausschließlich mit dem *Bakterien-* gehalt normaler Pflanzengewebe, denn das Vorkommen von *Pilzen* in solchen ist ja in bezug auf die Symbiosetheorie SCHANDERLS nur von sekundärer Bedeutung und überdies bereits von anderer Seite ein- gehend behandelt worden (NIETHAMMER, 1939; MARCUS, 1942).

Die wichtigsten Thesen SCHANDERLS sind genügend bekannt, weshalb ich auf eine zusammenfassende Wiedergabe derselben verzichten kann. Sie sollen dagegen im Zusammenhange mit den eigenen mitzuteilenden Befunden in

den einschlägigen Kapiteln dieser Arbeit einzeln eingehend besprochen werden.

Kann das Äußere pflanzlicher Objekte mit Sicherheit keimfrei gemacht werden?

Mit Recht hebt SCHANDERL immer wieder die Bedeutung dieser Frage für die Beurteilung seiner Bakterienisolierungen hervor. Als Beweis, daß das Äußere von Pflanzenmaterial durch seine Bädermethode sicher keimfrei zu machen ist, führt SCHANDERL (1947, S. 26—27) Modellversuche an.

Erbse große Gips-Kieselgur-Perlen wurden mit einer dichten Aufschwemmung von Sporenmaterial getränkt, mit verschiedenen Desinfektionsmitteln behandelt und die untere Grenze der Einwirkungszeiten bestimmt.

SCHANDERL bezeichnet Gips-Kieselgur-Perlen als besonders geeignet für derartige Versuche, weil sie eine große innere Oberfläche und Saugfähigkeit besitzen. Dem ist nun entgegenzuhalten, daß sich pflanzliches Material in den meisten Fällen gerade umgekehrt verhält: Es ist schlecht benetzbar und wirkt also nicht flüssigkeitsaufsaugend, sondern -abweisend! Sollen aber Modellversuche die Wirksamkeit der Desinfektionsmittel in ihrer praktischen Anwendung beweisen, so müssen Bedingungen geschaffen werden, die den tatsächlichen Verhältnissen möglichst nahe kommen. Nach diesen Überlegungen richtete ich meine Versuchsanordnung zur Prüfung der Desinfektionsmethoden ein.

Methodik: In je drei Parallelreihen wurden a) Deckgläser (HOFFMANN u. DEHMEL), b) Gips-Kieselgur-Perlen nach SCHANDERL und c) trockene Erbsen, nach einstündiger Behandlung im Autoklaven bei 120° C, mit einer dichten Sporenemulsion infiziert. Als Testkeime dienten ein rechtswendiger Stamm von *Bacillus mycoides*, dessen charakteristische Kolonien eine eindeutige Beurteilung der Ergebnisse ermöglichten, sowie von Nichtsporenbildnern *Bacterium prodigiosum* und *Micrococcus pyogenes aureus*. Zur Herstellung der Keimsuspensionen wurden eine Woche alte Schrägröhrchen (bei *Bac. mycoides* nach Prüfung auf freie Sporen) mit Bouillon abgeschwemmt und die Abschwemmung jeweils in das nächste Röhrchen übertragen. Die so erhaltenen, sehr dichten Aufschwemmungen wurden darauf zum Beschicken der Träger verwendet. Nach kurzer Trocknung bei 25° C wurden die infizierten Testobjekte in die zu prüfenden Desinfektionslösungen geworfen. Die Kontrolle auf überlebende Keime wurde nach verschiedenen Einwirkungszeiten in der üblichen Weise in optimalen Nährlösungen vorgenommen. Von diesen wurde entweder nach dem Anwachsen, oder, bei makroskopisch negativem Ausfall, nach 7, 17, 21 und 30 Tagen auf feste Nährböden abgeimpft. Die endgültige Beurteilung erfolgte nach achtwöchiger Kulturdauer. Eine kürzere Beobachtungszeit¹ erwies sich wiederholt, vor allem bei Sporenmaterial, als nicht ausreichend, was gut mit den Befunden von GELINSKY übereinstimmt, der bei Desinfektionsversuchen bis zu 12 Wochen Beobachtungszeit notwendig fand.

Sämtliche Serien ergaben übereinstimmend, daß die Deckglas-methode die kürzesten, das Gips-Kieselgur-Perlenverfahren mittlere und der Erbsentest die längsten Einwirkungszeiten der Desinfektionsmittel

¹ Angaben hierüber fehlen leider bei SCHANDERL.

erforderte. Als Beispiel sei das Ergebnis eines solchen Versuches in Tabelle I wiedergegeben.

Tabelle I. Desinfektionsmittelprüfung. Testkeime:
Micrococcus pyogenes aureus. (Protokoll: Sy-Des 46,29).

Desinfektionsmittel und Einwirkungszeit in Minuten			Methoden					
			Deckglas		Gips-Kieselgur- Perlen		Erbsen	
Alkohol 96 %	H ₂ O ₂ 10 %	Chloraminalkohol 10 % in 70 %	Probe 1	Probe 2	Probe 1	Probe 2	Probe 1	Probe 2
1/2	1/2	1/2	+	+	+	+	+	+
1	1	1	0	0	+	0	+	+
2	2	2	0	0	0	0	0	+
3	3	3	0	0	0	0	+	0
5	5	5	0	0	0	0	0	0
10	10	10	0	0	0	0	0	0

Ähnliche, wenn auch graduell etwas unterschiedliche Ergebnisse brachten auch die anderen Versuchsserien. Und zwar blieb es gleich, welche Desinfektionsmittel angewandt wurden. Auch die Reihenfolge der einzelnen Desinfektionsbäder erwies sich als grundsätzlich unwesentlich. Immer waren bei Verwendung von *Erbsen* als Träger bedeutend längere Einwirkungszeiten notwendig. In noch weit stärkerem Maße war dies der Fall, wenn rauhe, haarige Pflanzenorgane (z. B. Blätter bzw. Blattstiele von *Begonia*) mit den Testkeimen beschriftet wurden.

Worauf diese „Schutzwirkung“ des Pflanzenmaterials bei obigen Versuchen beruht, kann auf Grund meiner Befunde natürlich nicht gesagt werden. Wesentlich dürfte m. E. die schlechte Benetzbarkeit der äußeren Oberfläche von Pflanzenorganen sein, denn selbst beim Einlegen z. B. von Samen in Alkohol bemerkt man immer Luftbläschen, die einen Kontakt des Desinfektionsmittels mit der Oberfläche der Pflanzenorgane und den darauf befindlichen Keimen an vielen Stellen unmöglich machen. Gestützt wird diese Vermutung noch durch folgende Beobachtung: Wenn man vor den Desinfektionsbädern, am besten vor dem ersten Alkoholbad, für wenige Sekunden Xylol einwirken läßt, werden die sicher wirkenden Desinfektionszeiten fast immer ganz wesentlich herabgesetzt. Daneben konnte in Übereinstimmung mit SCHANDERL (1947, S. 27) durch entsprechende Reihenfolge der Bäder häufig ein günstiger Einfluß im Sinne einer Verkürzung der Desinfektionszeiten beobachtet werden. Jedoch war dieser in allen drei Testverfahren annähernd gleich wirksam².

² In diesem Zusammenhange seien noch die Feststellungen von R. MEYER erwähnt, der zeigen konnte, daß Kreide selbst im Autoklaven nicht mit Sicherheit zu sterilisieren ist. Die Ursache hiervon sind ebenfalls Luftsäckchen. Werden diese vorher durch Evakuieren entfernt, so gelingt die Sterilisation.

Aus diesen Ergebnissen geht eindeutig hervor, daß die mit der Gips-Kieselgur-Perlenmethode nach SCHANDERL ermittelten Desinfektionszeiten durchaus nicht ohne weiteres beim Arbeiten mit Pflanzenmaterial angewendet werden dürfen. Den Bakterienisolierungen SCHANDERLS, sowie allen anderen positiven Befunden, die mit den gleichen Desinfektionsmethoden erhalten wurden (HENNIG und VILLFORTH), wird man daher berechtigterweise mit Vorsicht begegnen müssen.

Für meine Isolierungsversuche wählte ich deshalb Pflanzenmaterial, das mit absoluter Sicherheit äußerlich keimfrei zu machen ist. Als besonders günstig erwiesen sich nach eingehenden Vorversuchen Kartoffelknollen, Samen bzw. Hülsen von *Vicia faba* und *Tomat*en.

Versuche mit Kartoffelknollen (*Solanum tuberosum*).

Methodik: Äußerlich gesund aussehende, unverletzte Knollen (möglichst längliche) wurden mit Seife und Bürste unter der Wasserleitung mehrere Minuten lang gereinigt, 15 Minuten auf einem Sieb mit fließendem Wasser gespült, dann für 30 Minuten in Chloraminalkohol³ oder 5% Sagrotan gelegt. Zuletzt wurden die Knollen abgeflammt und mit gut desinfizierten Händen, evtl. nach oberflächlichem Anschneiden, in zwei Teile gebrochen. Den völlig unberührten Bruchflächen wurden mit sterilem Skalpell etwa 1 cm³ große Zylinder entnommen und in die Nährlösung gebracht. Alle Manipulationen erfolgten teils in einer Impfkabine, teils im ausgedampften Impfkasten, sowie auch frei im Arbeitsraum in einem aufsteigenden Dampfstrom. Umfangreiche Blindversuche, bei denen die gleichen Handgriffe, aber stets doppelt solange und ohne Pflanzenmaterial vorgenommen wurden, ergaben, daß die Möglichkeit einer Luftinfektion bei exakter Arbeitsweise niemals größer als 1% war.

Als Nährlösungen fanden Verwendung: Bohnenwasser nach SCHANDERL (1939), Kartoffelwasser pH 7.2 nach LEHMANN u. NEUMANN⁴, sowie sterile 5%ige NaCl-Lösung, zu je 8–10 cm³ in Röhrchen abgefüllt und mit Wattestopfen, teils auch mit Kapsenberg-Kappe verschlossen. Bebrütet wurde 4 Wochen bei 25° C, dann weiter bei Zimmertemperatur. Gesamtbeobachtungsdauer: 4–8 Monate. Um möglichst gesicherte Werte zu erzielen, wurde mit *Kartoffeln* verschiedener Herkunft gearbeitet und die Isolierungsversuche mehrere Jahre hindurch wiederholt.

Betrachten wir zunächst das Gesamtergebnis von 800 Kulturen aus 200 Knollen, das in Tabelle II wiedergegeben ist. Zu diesen Versuchen wurden durchweg Knollen der vorjährigen Ernte verwendet, die mindestens 6, meistens sogar 10 und 12 Monate eingelagert waren.

Die Gesamtbilanz ergibt, daß von den 800 Isolierungen 204, also rund 39%, Bakterienwachstum ergaben. Da von jeder Knolle vier genau signierte Kulturen angelegt wurden, konnte auch festgestellt werden, wie viele der untersuchten *Kartoffeln* im Innern keimfrei, bzw. keimhaltig waren. Bei dieser Art der Berechnung zeigt es sich, daß von 200

³ 10% Rohchloramin in 70%igem vergälltem Alkohol.

⁴ Bakteriolog. Diagnostik, 4 Aufl. 1907, 2. Bd., p. 674, Rp. Nr. 10 (ohne Glyzerinzusatz!)

untersuchten Knollen nur 30 sich in allen vier Kulturen als im Innern steril erwiesen. Rund 86% der *Kartoffeln* ergaben also wenigstens in einer der vier Isolierungen Bakterienwachstum.

Tabelle II. *Isolierungsversuche mit Kartoffelknollen (vorjährig, mehrere Monate eingelagert).*

Herkunft	Kulturen			Knollen		
	Zahl	davon +	% +	Zahl	davon +	% +
Nd.-Bayern 1945	200	82	41,0	50	45	90,0
Ob.-Bayern 1945	200	61	30,5	50	41	82,0
Hessen 1942 u. 1943	300	107	35,7	75	62	82,7
Württemberg 1946	100	44	44,0	25	22	88,0
Insgesamt:	800	204	39 %	200	170	86 %

In Tabelle III ist das Ergebnis ähnlicher Untersuchungen mit frisch geernteten, bzw. nicht länger als 4 Wochen gelagerten *Kartoffelknollen* zusammengestellt.

Tabelle III. *Isolierungsversuche mit Kartoffelknollen (frisch geerntet).*

Herkunft	Kulturen			Knollen		
	Zahl	davon +	% +	Zahl	davon +	% +
Nd. Bayern 1946 u. 1947	200	15	7,5	50	4	8,0
Ob.-Bayern 1946 u. 1947	200	19	9,5	50	5	10,0
Hessen 1944	200	9	4,5	50	3	6,0
Württemberg 1947	100	6	6,0	25	3	12,0
Insgesamt:	700	49	7 %	175	15	9 %

Die Zahlen sind hier völlig andere. Waren bei den gelagerten *Kartoffeln* (Tab. II) 39% der angesetzten Kulturen positiv, so zeigten bei Verarbeitung frischer *Kartoffeln* nur 6,9% (49 von 700) Bakterienwachstum. Noch deutlicher wird der Gegensatz bei Bezug der Ergebnisse auf die Knollen. Hier stehen 86% (170 von 200) im Innern keimhaltigen gelagerten *Kartoffeln* nur 9% (15 von 175) frische Knollen gegenüber, die wenigstens in einer der vier angesetzten Kulturen Bakterienwachstum zeigten⁵.

Bei den früheren Untersuchungen (Herbst 1939) hatte ich ebenfalls mit frisch geernteten *Kartoffeln* gearbeitet und unter 24 Isolierungen (12

⁵ Eine eingehende bakteriologische Bearbeitung der von mir isolierten Keime ist im Gange und wird zu einem späteren Zeitpunkt veröffentlicht werden.

Knollen) nur 1 positive Kultur erhalten. Mein damaliger Befund (BURCK, S. 686): „Kulturelle Untersuchungen von *Kartoffeln* ... blieben gleichfalls erfolglos“, stimmt also völlig mit den oben mitgeteilten neuen Ergebnissen überein. Auch die absolut negativen Isolierungsversuche von BERTHOLD sind angesichts der geringen Zahl von Einzelkulturen (12 Kulturen, 2 Versuche) verständlich. Daß auch dieser Autor einen geringen Prozentsatz positiver Kulturen erhielt, zeigt seine Bemerkung (S. 396): „Trotzdem verlief eine Reihe von Versuchen mit negativem Erfolg; schließlich gelang es aber, alle Kulturen steril zu bekommen“^o.

Außer den oben besprochenen Isolierungen wurden noch Gefrierversuche angesetzt. SCHANDERL (1947, S. 9) weist darauf hin, daß schon WIGAND „Gewebe aus dem Innern gefrorener (!) Kartoffeln“ zu Bakterien-Isolierungsversuchen heranzog und SCHANDERL (S. 35 ff.) verwendet ebenfalls den Frost zur „Lösung der Symbiose“.

Die Tabelle IV gibt eine Übersicht über Methodik und Ergebnisse der von mir angestellten Gefrierversuche.

Tabelle IV. *Gefrierversuche mit Kartoffelknollen (4 Wochen gelagert).*

Methoden	Zahl der Versuche	% + Kulturen
Knollen unsteril in sterilen Glasdosen 24 Std. bei -10° gehalten	alle Proben nach dem Einfrieren 24 Std. bei 25° C aufgetaut jeweils 50 Kulturen aus 10 Knollen angesetzt	26%
Knollen gewaschen, desinfiziert, dann wie oben eingefroren		10%
Knollen gewaschen, desinfiziert, zweimal je 2—3 mm dick steril geschält, dann wie oben eingefroren		8%

Wie obige Zusammenstellung zeigt, erhält man durch das Einfrieren nur dann eine höhere Ausbeute an positiven Kulturen, wenn die Oberfläche der Knollen nicht ganz steril ist. Die Vermutung ist nahelegend, daß Oberflächenkeime durch entstehende Frostspalten beim Auftauen in das Innere der Knollen gelangen, wo sie durch die abgestorbenen Zellen mit genügend Nährstoffen versorgt werden, wodurch eine rasche Vermehrung ermöglicht wird. Ich möchte jedoch betonen, daß diese Gefrierversuche nicht ohne weiteres mit den von SCHANDERL (1947, S. 36) mitgeteilten Befunden verglichen werden können, da dieser ja desinfizierte Kartoffelstücke dem Gefrierprozeß aussetzte. Leider sind in keiner der Arbeiten SCHANDERLS genaue Zahlenangaben zu finden, so daß selbst bei Einhaltung seiner Methodik kein Vergleich möglich wäre.

Auch ich konnte vielfach beobachten, daß sich bei dem Einbringen von gefrorenem Material in 5%ige Kochsalzlösung oder auch nur in

^o Über Unterschiede von frischem und gelagertem Material vgl. auch DI VESTEA und POTTER!

Wasser oft schneller Wachstum einstellte als bei Verimpfung lebenden Gewebes in eine dieser Flüssigkeiten oder selbst in Bohnenwasser. Die Auslaugung der durch das Einfrieren geschädigten oder gar getöteten Gewebe geht natürlich schneller vor sich als bei lebendem Zellmaterial. Die Versorgung mit Nährstoffen ist also im ersten Falle besser und demgemäß auch das Wachstum rascher. Es gelang mir aber niemals, einen höheren Prozentsatz an positiven Kulturen bei Verwendung gleichen Ausgangsmaterials durch den Gefrierprozeß zu erzielen.

Versuche mit Samen der Puffbohne (*Vicia faba*).

Methodik: Zur Verarbeitung kamen drei Sorten von *Vicia faba*: var. *Hangdown*, var. *agrorum* und var. *columbina*. Völlig unversehrte, gesund aussehende Hülsen wurden durch Scherenschlag von den Pflanzen abgenommen, in sterilen Glasdosen ins Laboratorium gebracht und sofort verarbeitet. Die Hülsen wurden für 20–30 Min. in Chloraminalkohol gelegt, worin sie ganz dunkel werden, darauf mit steriler Pinzette gefaßt und abgebrannt. Unter größten Vorsichtsmaßregeln wurden die Hülsen geöffnet, die völlig unberührten Samen einzeln entnommen und ohne weitere Desinfektion in sterile Nährlösung gebracht. Als solche diente Bohnenwasser nach SCHANDERL (1939), zu 8–10 cm³ in Röhrchen abgefüllt. Weiterhin wurden aus einem Teil der so gewonnenen Samen mit sterilen Instrumenten die Kotyledonen mit dem Keimling herauspräpariert und ebenfalls sofort in die Nährlösung geworfen.

Inwieweit bei diesen Manipulationen mit Luftinfektionen zu rechnen ist, untersuchte ich durch folgendes Verfahren: Die Hülsen wurden im Autoklaven 1/2 Std. bei 1,5 Atü sterilisiert und dann in gleicher Weise behandelt wie das lebende Material. Von 100 mit Samen beschickten Röhrchen zeigten 4 Wachstum (1 *Sarcina*, 1 *Sporenbildner*, 2 *Schimmel*) und unter 50 mit präparierten Kotyledonen angesetzten Kulturen erwiesen sich nur 3 (sämtlich *Schimmel*) als unsteril. Luftinfektionen kommen also bei der geschilderten Versuchsanordnung als Fehlerquelle kaum in Frage.

Beobachtungszeit bei sämtlichen Bohnenversuchen, einschließlich der Kontrolluntersuchungen mit sterilisiertem Material: 4 Wochen bei 25° C, dann weitere 4–6 Monate bei Zimmertemperatur.

In Tabelle V ist das Ergebnis von 400 mit ganzen Samen und 200 mit nach obiger Methode präparierten Kotyledonen angesetzten Kulturen wiedergegeben.

Tabelle V. Versuch mit *Vicia faba*-Samen.

Objekt	Anzahl	davon +	% +
junge grüne Samen	200	42	21
ebenso, nur Kotyledonen	100	5	5
ältere grüne Samen	200	172	86
ebenso, nur Kotyledonen	100	33	33

Auffällig ist hier vor allem der hohe Prozentsatz unsteriler Kulturen bei Verwendung älteren Samenmaterials, während junge, zarte Samen

weitaus mehr sterile Züchtungen lieferten. Methodische Fehler können dafür umso weniger verantwortlich gemacht werden, als das Präparieren junger, kleiner Samen weitaus schwieriger ist und dementsprechend länger dauert. Würde es sich bei den erhaltenen positiven Kulturen also um Luftinfektionen handeln, so wäre gerade ein gegenteiliges Ergebnis weitaus wahrscheinlicher.

Überraschend war zunächst auch das häufige Auftreten von Bakterienwachstum überhaupt, denn auch ganz junge Samen von etwa 4–6 mm Größe erwiesen sich, wie Tabelle V zeigt, zu 21% als unsteril. Mit anderem Material erhielt ich im Gegensatz zu diesen Ergebnissen weitaus geringere Zahlen. Nähere Angaben hierüber sind in Tabelle VI zusammengestellt.

Das Hauptergebnis dieser mehrjährigen Freilandversuche, kombiniert mit Isolierungsversuchen nach völlig gleichen Methoden, ist, daß für den Keimgehalt der Samen mit größter Wahrscheinlichkeit die Bodenflora des jeweiligen Standortes ausschlaggebend zu sein scheint. Je länger *Vicia faba* auf der gleichen Parzelle gebaut wurde, desto höher liegen die Prozentzahlen positiver Bakterienisolierungen mit Samen und Kotyledonen.

Die aus Tabelle V ersichtlichen hohen Werte stimmen mit diesem Ergebnis durchaus überein, denn die zu jenen Versuchen benutzten Pflanzen standen in einem Teil des Botanischen Gartens Hohenheim, auf dem seit Jahren ausschließlich *Leguminosen* gebaut wurden.

Ob die von mir isolierten Keime (im wesentlichen nur zwei Formen) verwandt oder sonst irgendwie mit den von HILTNER genannten *Pektin-zersetzern* in Beziehung zu bringen sind, müssen weitere Untersuchungen zeigen. Wesentlich erscheint mir aber in diesem Zusammenhange ein Hinweis auf die Beobachtungen HILTNERs, die ebenfalls ergaben, daß der Boden bei langjähriger Monokultur mit *Leguminosen* eine Anreicherung bestimmter Bakterienformen zeigt. Erwähnen muß ich noch, daß die von mir erhaltenen Kulturen in vielen Punkten gut mit den Angaben SCHANDERLs übereinstimmen: Sporenbildung, graurötliche Haut in Bohnenbrühe, flockiger Bodensatz usw.⁷

An dieser Stelle ist auch auf die scheinbar von meinen Ergebnissen abweichenden Befunde von STÜHRK einerseits und MARCUS andererseits einzugehen. Zwar hat STÜHRK nicht mit genau dem gleichen Material gearbeitet wie ich, doch ist wohl anzunehmen, daß die Verhältnisse bei nahe verwandten *Leguminosen* nicht allzu sehr von einander abweichen werden. Daß STÜHRK in einem so hohen Prozentsatz (70% bei *Erbsen*, 100% bei *Bohnen*) positive Kulturen erhielt, ist verständlich, wenn man bedenkt, daß dieser Autor jedes Röhrchen nicht mit je einem, sondern gleich mit 15 Samen beschickte. Ist aber auch nur ein einziger Samen keimhaltig, so muß natürlich die ganze Probe Bakterienwachstum ergeben. Dadurch wird aber die Fehlergrenze ganz wesentlich vergrößert. Theoretisch könnte das Ergebnis STÜHRKs noch möglich sein, wenn nur rund 0,7% der Samen keimhaltig wären! Dann müßte allerdings in jeder Probe zu 15 Samen gerade 1 unsteriler sein, was natürlich völlig unwahrscheinlich ist. Für die Erbsen-

⁷ Vgl. Fußnote S. 313.

Tabelle VI. Feldversuche mit *Vicia Faba* var. *columbina*, var. *agrorum* und var. *Handglohn*.
Bestimmung des Keimgehaltes in den einzelnen Versuchsjahren, Einfluß der Fruchtfolge.

Versuchsjahr	Parzelle A			Parzelle B			Parzelle C			Parzelle D		
	Fruchtfolge	Samen + in %	Kotyled. + in %	Fruchtfolge	Samen + in %	Kotyled. + in %	Fruchtfolge	Samen + in %	Kotyled. + in %	Fruchtfolge	Samen + in %	Kotyled. + in %
1942	Tomaten, Grünkohl	—	—	<i>Vicia faba</i>	—	—	Tomaten, Grünkohl	—	—	Tomaten, Grünkohl	—	—
1943	<i>Vicia faba</i>	9	1	<i>Vicia faba</i>	17	2	Kartoffeln	—	—	Kartoffeln	—	—
1944	<i>Vicia faba</i>	11	3	<i>Vicia faba</i>	20	3	Zuckerrüben	—	—	Zuckerrüben	—	—
1945*)	<i>Vicia faba</i>	—	—	<i>Vicia faba</i>	—	—	<i>Vicia faba</i>	—	—	Sommergerste	—	—
1946	<i>Vicia faba</i>	45	17	<i>Vicia faba</i>	57	16	<i>Vicia faba</i>	19	4	<i>Vicia faba</i>	7	1
1947	<i>Vicia faba</i>	59	19	<i>Vicia faba</i>	73	25	<i>Vicia faba</i>	37	9	<i>Vicia faba</i>	21	5

Es kamen jeweils 100 Samen und 100 steril präparierte Kotyledonen zur Verarbeitung (Vgl. Methodik S. 10).

*) In diesem Versuchsjahr mußten aus äußeren Umständen die Keimisolierungen unterbleiben.

versuche von STÜHRK läßt sich variationsstatistisch der Gehalt der Proben an bakterienhaltigen Samen mit etwa 15—30% errechnen, was durchaus mit den von mir ermittelten Werten bei *Vicia faba* übereinstimmt. Bemerkenswerterweise sagt ja STÜHRK selbst: „Wie aus den Versuchen mit *Erbsen* hervorgeht und auch bei früheren Untersuchungen an *Erbsen* schon festgestellt werden konnte, kommen diese resistenten Formen allerdings nicht immer vor“.

Völlig entgegengesetzt erscheinen zunächst die Ergebnisse von MARCUS (1942, S. 22), der *Vicia faba*-Samen im Innern zu 100% keimfrei fand. Wie meine Untersuchungen zeigen (vgl. Tabelle V und VI!), erweist sich das Innere (Kotyledonen!) nur unter besonderen Umständen maximal zu etwa 23% als unsteril. Meistens wird der Prozentsatz keimhaltiger Kotyledonen weit darunter liegen, nämlich bei etwa 3—5%. Da MARCUS aber insgesamt mit nur 16 Samen gearbeitet hat, ist es verständlich, daß er diesen niedrigen Prozentsatz nicht erfassen konnte. Außerdem arbeitete MARCUS mit äußerlich desinfizierten Kotyledonen, aus deren Innern er steril Proben entnahm!

Ganz besonders betonen möchte ich aber, daß durch meine oben mitgeteilten Ergebnisse nicht ein intrazelluläres Vorhandensein von Keimen nachgewiesen wird. Die isolierten Bakterien saßen vielmehr auf der Oberfläche der Samen bzw. der Kotyledonen; im letzten Falle also unter der Samenschale. Einen klaren Beweis für die Richtigkeit dieser Auffassung bringt folgende Beobachtung: bei 300 negativ verlaufenen Kulturen mit ganzen Samen und 200 ebensolchen mit steril präparierten Kotyledonen wurde das Gewebe wie bei den Versuchen von STÜHRK steril zerquetscht. Nicht eine einzige dieser Kulturen erbrachte danach, also aus dem Innern heraus, doch noch Bakterienwachstum! Die Möglichkeit von Luftinfektionen wurde mit Sicherheit ausgeschaltet durch Einklassen eines Glasstabes durch den Wattestopfen hindurch schon vor dem Einfüllen des Nährbodens.

Versuche mit Tomaten (*Solanum lycopersicum*).

Methodik: Es wurden Früchte verschiedener Herkunft und Reifegrade untersucht. Die ausgewählten *Tomaten* wurden mit der Schere samt den Fruchtsielen von der Pflanze abgetrennt, in sterilen Glasdosen in das Laboratorium gebracht und sofort weiter verarbeitet. Nach umfangreichen Vorversuchen, bei welchen die Oberfläche der *Tomaten* mit resistenten Sporen infiziert worden war, wurde folgende Art der sterilen Probenentnahme als die günstigste ermittelt. Die Früchte kamen nach Abwaschen mit Seife und hartem Pinsel für 30 Min. in Chloraminalkohol (10% in 70%igem Alkohol), dieser wurde darauf abgebrannt und die Tomaten unter dauerndem Drehen seitlich so lange in die Bunsenflamme gehalten, bis sie rundum einen Ring völlig verkohlter Epidermis aufwiesen. Die Früchte wurden dabei mit einer Pinzette oder Pean-Klemme gehalten. Auf steriler Unterlage (Petrischale) wurden die Tomaten durch einen raschen Schnitt mit noch zischend heißem Skalpell in zwei Teile geteilt und mit steriler Pinzette, je nach der Größe der Frucht, 2—5 erbsen- bis erdnußgroße Proben herausgerissen. Diese wurden stets dem inneren Fruchtfleisch entnommen, das mitsamt den anhängenden Samen sofort in sterile Nährlösung geworfen wurde. Als solche diente überwiegend Bohnenwasser nach SCHANDLER (1939), in einzelnen Vergleichsversuchen auch 5%ige Kochsalz- bzw. Natriumbicarbonatlösung,

sowie Bohnenwasser nach dem Rezept von HENNIG u. VILLFORTH⁸. Die Nährlösungen waren zu 8–10 cm³ in Röhrchen abgefüllt. Beobachtungszeit: 4 Wochen bei 25° C, dann weitere 4–6 Monate bei Zimmertemperatur.

Das Gesamtergebnis von 600 Isolierungen aus 248 Tomaten ist in Tabelle VII, linke Hälfte, zusammengestellt. Die Kulturen erwiesen sich zu 72%, die Früchte sogar zu 94% keimhaltig. Von sämtlichen positiven Röhrchen wurden Plattenkulturen angelegt und Reinzüchtungen vorgenommen. Rund 79% der so gewonnenen Reinkulturen erwiesen sich als zu einer Bakterienart gehörend. Es handelt sich dabei um mittelgroße, nach GRAM färbbare *Kokken*, die meist in Traubenform wachsen, mitunter aber auch Diplokokken und Tetradenbildung zeigen.

Die jungen Agarkolonien sind rundlich, mäßig erhaben, schwach glänzend und gelblichweiß. Nach einigen Tagen zeigen sie ein erhabeneres, gelbes Zentrum und gelapte, flache, graue Randpartien, mitunter auch Knopfbildung. Auf Schrägagar bilden sich später auffallend trockene, gelbgraue Impfstiche; das Kondenswasser ist schwach krümelig getrübt. Auf sterilen Kartoffelscheiben entstehen in wenigen Tagen flache, trockene, gelbgraue Impfstiche mit gezacktem Rand und oft knopfartigen Sekundärkolonien. Im Gelatinestich langsame, schalenförmige Verflüssigung, krümeliger, grauer Bodensatz am Grunde der Verflüssigungszone und gelblicher, zackiger Ring am Rande. Nach diesen, sowie anderen Merkmalen⁹ kann diese Form als nahe verwandt bzw. identisch mit dem *Micrococcus coronatus* (Flügge) betrachtet werden. Eine kurze Beschreibung erfolgte hier, weil auch SCHANDERL (1939, S. 432) 1,3–2,0 μ große Kokken aus Tomaten isolierte.

Wie aus meinen Versuchen (Tab. VII, rechte Hälfte) weiter hervorgeht, fanden sich neben diesen sehr häufig vertretenen Kokkenformen aber auch andere Keimarten. Einfachheitshalber seien sie hier, statt mit ihren Namen, mit Zahlen benannt. Ein Vergleich der Angaben über den Standort der Pflanzen mit den gefundenen Keimarten zeigt auf den ersten Blick, daß die Bakterienflora der Tomaten umso einfacher zusammengesetzt ist, je keimärmer die Luft ist. Aus den im Gewächshaus gezogenen Tomaten konnten nur 3 Bakterienformen isoliert werden. Im Freiland steigt die Artenzahl dagegen bis zu 7 an, wenn die Pflanzen keimreicherer Luft ausgesetzt sind, was besonders bei den Proben Bayern I und II deutlich zum Ausdruck kommt. Auch die relative Häufigkeit der einzelnen Keimarten schwankt je nach dem Standort beträchtlich. So enthielt die Probe Württemberg I in 91% den gelben *Micrococcus*, während die restliche Keimflora nur 9% betrug. Die Probe Bayern II hingegen erbrachte nur in 60% der positiven Kulturen die Kokkenform, dafür aber 40% andere Keime.

Dieses auffallende Ergebnis allein müßte jedoch durchaus noch nicht in direktem Widerspruch zu der SCHANDERLSchen Symbiosetheorie stehen. Es mußte vielmehr experimentell ermittelt werden, woher die aus dem Innern gesunder Tomaten isolierbaren Keime stammen. Am wahrscheinlichsten schien von vornherein ein Eindringen durch den Griffel. Diese Möglichkeit wurde daher zuerst geprüft.

⁸ Weniger konzentriert als die Nährlösung von SCHANDERL.

⁹ Vgl. Fußnote S. 313.

Tabelle VII. Isolierungsversuche mit Tomaten. Einfluß des Standortortes auf den Keimgehalt der Früchte.

Herkunft	Standort	Kulturen			Früchte			Häufigkeit der gefundenen Keimarten in % der positiven Kulturen*)							
		Zahl	davon +	+ in %	Zahl	davon +	+ in %	1	2	3	4	5	6	7	8
Württbg. I	Gewächshaus	150	111	74	60	58	97	91	8	1	—	—	—	—	—
Württbg. II	Institutsgarten, inmitten einer Tomatenkultur	150	102	68	60	54	90	84	8	3	5	—	—	—	—
Württbg. III	Privatgarten, abgelegen, staubfrei	100	65	65	33	28	85	87	2	4	1	6	—	—	—
Bayern I	Garten, in Straßennähe	100	71	71	50	48	96	71	9	3	2	4	7	—	4
Bayern II	Garten, 2 m neben Straße, Pflanzen völlig verstaubt	100	83	83	45	45	100	60	17	3	9	11	8	2	—
Gesamt-Bilanz:		600	432	72	248	233	94	78,6	8,8	2,8	3,4	4,2	3,0	0,4	0,8

*) Zahlen abgerundet!

Methodik: Verschieden alte Blüten der Gewächshaus-Tomatenpflanzen (Württbg. I) wurden an der Staupe durch angehängte Marken bezeichnet. Mit sterilen Präpariernadeln wurde die Antherenröhre vorsichtig an einer Seite gespalten und so der Griffel freigelegt. Auf die Narbe wurde mittels Platinöse oder Pinsel eine Reinkulturaufschwemmung eines rechtswendigen Stammes von *Bacillus mycoides* aufgetragen und darauf die Blütenteile in die Normallage zurückgebracht. Ebenso wurde mit Kulturen der gelben, aus Tomaten isolierten Kokken, sowie mit *Pseudomonas fluorescens* verfahren. Nach einigen Wochen wurden die herangewachsenen Früchte nach bereits beschriebenen Verfahren (S. 318 f.) zu Kulturen verarbeitet.

Das Ergebnis dieser Versuche zeigt Tabelle VIII. In 17 Früchten, die sich aus infizierten Blüten entwickelt hatten, konnte in 35 Kulturen 32mal die ausgeimpfte Keimart (*gelbe Kokken*) wiedergefunden werden. Da sich aber auch normalerweise diese Keimart häufig in *Tomaten*-früchten vorfindet, könnte dieser Befund als nicht stichhaltig angesehen werden. Allerdings muß folgendes hervorgehoben werden. Während die Kulturen aus normalen, gesunden Tomaten makroskopisch nie vor dem 5. Tage das Wachstum der Kokken erkennen lassen, zeigten die künstlich infizierten Früchte oft schon nach 3 Tagen einen kräftigen gelben Ring an der Oberfläche oder graugelbe, spinnwebartige, netzige Beläge an der Röhrchenwandung. Eine so massige Infektion konnte ich bei keiner einzigen der untersuchten normalen *Tomaten* feststellen.

Tabelle VIII. Narben-Infektionsversuche mit verschiedenen Keimarten an Tomaten (Gewächshaus).

Keimart	Infizierte Blüten	Kein Fruchtansatz	Fruchtansatz	Kulturen	Die geimpfte Keimart wurde in Kulturen wiedergefunden
<i>Gelbe Kokken</i> aus Tomaten	30	13	17	35	32
<i>Bac. mycoides</i> , rechtswendig	30	6	24	42	3
<i>Pseudomonas</i> <i>fluorescens</i>	30	9	21	40	0

Ganz eindeutig ist aber das Ergebnis der Versuche mit *Bac. mycoides*. Daß sich aus 3 der angesetzten 42 Kulturen Stämme isolieren ließen, die alle Eigenschaften des Ausgangsstammes zeigten (Rechtswendigkeit!), kann kein Zufall gewesen sein! Zudem wurde in 25 Kontrollkulturen mit unsterilen Organen derselben Tomatenpflanzen nicht ein einziges Mal *Bac. mycoides* und erst recht nicht die viel seltenere rechtswendige Form desselben gefunden. Dieses Ergebnis beweist ein-

deutig, daß Keime von der Narbe her durch den Griffel in die Frucht eindringen können.

Wie Tabelle VIII zeigt, fielen gleiche Versuche mit *Pseudomonas fluorescens* negativ aus. Eine nähere Besprechung dieses Befundes soll in einem späteren Kapitel erfolgen.

Könnten aber nicht doch die so häufig gefundenen *gelben Kokken* die eigentlichen, von SCHANDERL behaupteten „Symbionten“ sein, während alle anderen Keime nur gelegentliche Infektionen darstellen? Diese Frage konnte nur beantwortet werden durch den Nachweis der Herkunft dieser Kokken. Nach SCHANDERLS Auffassung leben die „Symbionten“ in sämtlichen Zellen der Pflanze in Gestalt der sogen. Chondriosomen. Sie müßten also auch in den Pollenkörnern, bzw. den Pollenschläuchen zu finden sein. Diese Überlegung führte mich zu folgenden Versuchen.

Methodik: Antheren eben geöffneter Tomaten-Blüten wurden mit sterilen Pinzetten ausgerissen und durch Anklopfen derselben auf den Rand einer Petrischale der Pollen auf die Oberfläche darin erstarrten Bohnenagars gestäubt. Alle Manipulationen erfolgten stets unter streng aseptischen Kautelen. Die Platten wurden bei 25° C aufbewahrt.

Nach 3—7 Tagen zeigten sich auf den Platten bis zu 15 Kolonien der *gelben Kokkenart*, daneben ganz vereinzelt *Schimmelpilze*. Die Untersuchung der Platten mit dem binokularen Präpariermikroskop ergab folgendes Bild. Zwischen den großen, dunkel erscheinenden *Kokkenkolonien* liegen zahlreiche gekeimte Pollenkörner. Die Keime können sich also auf dem gebotenen Nährboden entwickeln und auch die Pollenkörner treiben Keimschläuche. Von mehreren Plattenserien wurden nun nach verschiedenen Bebrütungszeiten (5 Stdn. bis 14 Tage) mit sterilen Deckgläschen Klatschpräparate angefertigt und diese nach verschiedenen Methoden fixiert und gefärbt. In rund 3000 durchmusterten Pollenschläuchen, die sehr klar alle Einzelheiten zeigten (Abb. 1), konnten auch nicht ein einziges Mal „Bakteroiden“ oder gar eine Regeneration solcher zu Bakterien (*Kokken*) beobachtet werden!

Andererseits war mitunter deutlich zu sehen, daß die sich entwickelnden *Kokkenkolonien* von der Oberfläche eines Pollenkornes ausgingen, während sich der Keimschlauch völlig keimfrei zeigte.

Direkte Regenerationsversuche aus Pollenschläuchen in feuchten Kammern mit verschiedenen Nährlösungen erbrachten überhaupt in keinem Falle Bakterienwachstum. Dieses Ergebnis, sowie verschiedene Beobachtungen

bei den eben beschriebenen Pollenversuchen auf Agarplatten legen die Vermutung nahe, daß die auf den Platten angegangenen Kolonien der *gelben Kokken* überhaupt nicht von den Pollenkörnern

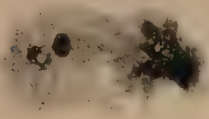


Abb. 1. Pollenschlauch. Klatschpräparat von Bohnenagar, vegetativen und generativen Kern zeigend, jedoch keine Symbionten. Methylenblau, Vergr 350:1

herstammen; sie scheinen von der Oberfläche der Antheren her zu kommen, denn gerade dort, wo versehentlich einmal bei Ausklopfen derselben der Nährboden mit ihnen berührt wurde, entwickelten sich die *Kokken*kolonien am häufigsten.

Zur Frage der „Bakteroiden“ Schanderls und deren „Regeneration“.

Es soll nun näher auf rein bakteriologische Fragen eingegangen werden, die für die Beurteilung der Symbiosetheorie SCHANDERLS von ausschlaggebender Bedeutung sind. Immer wieder betont SCHANDERL, die „symbiotischen“ Bakterien würden fast immer in stark veränderter Form im Innern der Pflanzenzellen leben und die Rückkehr zur normalen Bakteriengestalt gehe über mancherlei Zwischenstufen vor sich (SCHANDERL, 1947; Abb. 3—9). In dauernden mikroskopischen Kontrollen der angelegten Kulturen suchte ich nach diesen von SCHANDERL beschriebenen Formen.

In nicht wenigen mit Tomatenfruchtfleisch beimpften Röhren fanden sich in der Tat nach 3- bis 8-tägiger Bebrütung Gebilde, die weitestgehende Übereinstimmung mit den Beschreibungen SCHANDERLS zeigten. Die Abbildung 2 stellt solche „Bakteroiden“ aus *Tomaten*kulturen dar. In manchen Fällen waren auch die „chinesischen Schriftzeichen“ in schöner Ausbildung zu sehen (Abb. 3). Die von SCHANDERL (1947; S. 37; Abb. 7 u. 9) beschriebenen und abgebildeten „Winkel- und Kreuzformen“ fand ich ebenfalls in meinen Kulturen wieder (Abb. 4). Ja aus manchen Röhren der *Tomaten*versuche wurden Präparate gewonnen, die zunächst sogar den Übergang der mehr oder weniger stäbchenförmigen „Bakteroiden“ in die *Kokken*form der

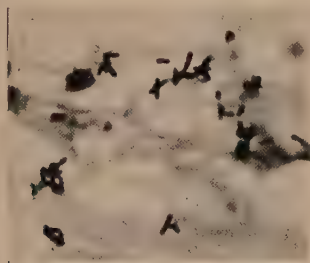


Abb. 2. „Bakteroiden“ aus Tomatenfleisch, 4 Tage in Bohnenwasser bei 25° C. Gram-Färbung. Vergr. 1000 : 1.



Abb. 3. „Chinesische Schriftzeichen“ (*Corynebact. bruneum*) aus Tomatenkultur, 5 Tage in Bohnenwasser bei 25° C. Gentianaviolett. Vergr. 1000 : 1.

„Tomatensymbionten“ zu zeigen schienen (Abb. 5).

Eine eingehendere bakteriologische Prüfung ergab jedoch folgenden Sachverhalt. Die oben beschriebenen Formen lieferten fast in allen Fällen Reinkulturen des *Corynebacterium bruneum* (SCHRÖHER)

K. & B., das, wie fast alle Vertreter der Gattung *Corynebacterium*, durch besonderen Formenreichtum ausgezeichnet ist. Die gleiche Bakterienform wurde von MARCUS im Inneren von Kürbissen nachgewiesen. Waren daneben, wie so oft, auch noch die schon (S. 319) beschriebenen *Kokken*formen vorhanden, dann kamen häufig Präparate zur Beobachtung, die sehr leicht einen Übergang von „Bakteroiden“ in die *Kokken*form vortäuschen können. Impfte ich von solchen Mischkulturen auf Bohnenagar aus, dann kamen fast immer nur die *gelben Kokken* zur Entwicklung; die „Regeneration“ schien



Abb. 4. „Winkel-“ und „Kreuzformen“. Tomaten-Bohnenwasserkultur, 5 Tage bei 25° C. Methylenblau. Vergr. 1900 : 1.

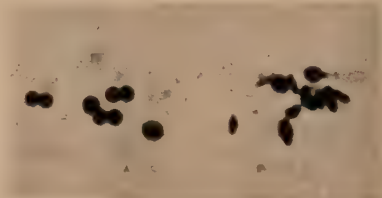


Abb. 5. Scheinbarer Übergang von Stäbchen- in Kokkenform. Bohnenwasser, 6 Tage bei 25° C. Gram-Färbung. Vergr. 2000 : 1.

vollendet. Wurde dagegen auf Glycerinagar ausgeimpft, so entstanden neben den *Kokken*kolonien massenhaft die typischen gelben, fettglänzenden Ansiedlungen des *Corynebact. bruneum*! Dementsprechend war auch das mikroskopische Bild der Ausgangskultur (Tomatengewebe in Bohnenwasser) bei längerer Beobachtung: Durch Wochen, ja durch Monate hindurch waren beide Formen, *Kokken* und *Stäbchen*, nebeneinander nachzuweisen (Abb. 6). Um dem allenfalls möglichen Einwand zu begegnen, man könnte viel-



Abb. 6. Tomatenkultur in Bohnenwasser mit Stäbchen und Kokken, 36 Tage bei 25° C. Gram-Färbung. Vergr. 2000 : 1

leicht an einen Übergang einer Bakterienform in die andere (*Stäbchen-Kokken*) denken, wurden bis zu 200 Subkulturen der isolierten Stäbchen 2 Jahre hindurch in Glycerin-Bohnenwasser vorgenommen. Das Ergebnis war, wie zu erwarten, stets dasselbe. Die Stäbchen blieben was sie waren: *Corynebacterium bruneum*.

Auf eine nähere Besprechung verschiedener bakteriologischer Ansichten und Behauptungen SCHANDERLS (1947, S. 60 ff.) („*Bact. planticola rubescens*“, „Sporenbildung“ bei *Bact. radiculicola* etc.) möchte ich verzichten (vgl. A. RIPPEL).

Dagegen soll hier die Bedeutung des Nährbodens für die Isolierung von Bakterien aus normalem Pflanzengewebe behandelt werden. In seiner ersten Arbeit sagt SCHANDERL (1939, S. 434), die Versuche früherer Autoren, aus normalen Pflanzengeweben Bakterien zu züchten, seien deshalb negativ verlaufen, weil ungeeignete Nährböden zur Anwendung gekommen seien. Demgegenüber wies ich (BURCIK, 1940) darauf hin, daß dem Nährboden kaum eine so überragende Bedeutung für den Ausfall von Bakterienisolierungen aus Pflanzenorganen zukommen könne, denn auch bei Anwendung des SCHANDERLSCHEN Bohnenwassernährbodens konnte ich die in *Tussilago*-Wurzeln angeblich vorhandenen Keime nicht erhalten. Diese Ansicht wurde inzwischen von anderer Seite (K. RIPPEL; MARCUS, 1942) experimentell bestätigt. SCHANDERL selbst (1944; 1947, S. 34—35) gab später an, daß nicht nur mit Bohnenwasser, sondern auch mit anderen Nährlösungen, sogar mit Kochsalz-, bzw. Natriumbicarbonatlösung, ja auch mit reinem Wasser und Pflanzengewebe Bakterienisolierungen möglich seien.

SCHANDERL betont oft (z. B. 1944, Tab. 1, S. 327), daß ihm vielfach die „Regeneration“ der „Bakterioiden“ zu richtigen Bakterienformen nicht gelang. Meine Erfahrungen mit dem *Corynebacterium bruneum* könnten eine Erklärung der auffälligen Befunde SCHANDERLS geben. In den Originalkulturen (Bohnenwasser + Tomatengewebe) findet zwar eine gewisse Vermehrung der Keime statt, doch kommt es zur Bildung atypischer Wuchsformen, weil der Nährboden nicht optimal für diese Bakterienart ist. Impfte man davon in Bohnenwasser oder auf Bohnenagar ab, so kam es meistens zu keiner weiteren Entwicklung. Setzte ich dagegen dem Bohnenwasser etwas steril filtrierten Saft aus *Tomaten* zu, so kamen wiederum die schon von den Originalkulturen her bekannten „Bakterioiden“ (Abb. 5 und 6) zur Ausbildung. Es müssen also im *Tomatensaft* Stoffe enthalten sein, die diesen Keimen ein, wenn auch geringes Wachstum ermöglichen. (Vgl. auch NIETHAMMER, 1940; MARCUS, 1942, S. 7). Durch Übertragung auf Glycerin-Nährböden konnten jederzeit üppige Kulturen des *Corynebact. bruneum* erhalten werden.

Bei weniger anspruchsvollen Formen wird ein solcher Einfluß des Nährbodens nicht zu bemerken sein. Dies dürfte m. E. die Ursache sein für die Beobachtung SCHANDERLS (1947, S. 36—37), daß sich in vielen Fällen die „Regeneration der Symbionten“ zu normalen Bakterienformen sehr rasch vollzieht.

Insofern kann also u. U. der Nährboden tatsächlich einen gewissen Einfluß auf die Entwicklung der aus dem Pflanzeninnern stammenden Keime ausüben. Die Schlußfolgerungen SCHANDERLS, dieses Verhalten sei ein Beweis mehr für die Symbiontennatur der isolierten Bakterien, erscheinen jedoch in keiner Weise gerechtfertigt.

Über die Bedeutung der Beobachtungsdauer bei Züchtungsversuchen aus dem Pflanzeninnern habe ich ebenfalls eingehende Beobachtungen

angestellt. SCHANDERL (1947, S. 64—65) führt ja den negativen Ausfall von Isolierungsversuchen anderer Autoren auf eine zu kurze Beobachtungsdauer zurück (z. B. BURCIK, 1940; K. RIPPEL, 1940). Es geht aber aus dieser Kritik SCHANDERLS nicht hervor, warum bei diesen Untersuchungen rund 3 bzw. 5 Wochen Bebrütungsdauer nicht genügen sollen, während bei anderen Autoren, deren Ergebnisse SCHANDERL zur Stützung seiner Ansichten besonders heranzieht „die Bakterienvermehrung . . . bei diesen Versuchen im allgemeinen schon innerhalb 24 Stunden, und zwar in sehr starkem Maße“ erfolgte. (HENNIG und VILLFORTH, S. 303).

In meinen Versuchen wurde nach Möglichkeit stets der Zeitpunkt bestimmt, an dem die angelegten Kulturen zuerst Bakterienwachstum zeigten. Die makroskopische Beobachtung der Röhren erwies sich vielfach als hierzu nicht ausreichend. Vor allem die Kulturen aus *Tomatens* erschienen dem bloßen Auge häufig lange Zeit hindurch steril, während eine mikroskopische Untersuchung schon tagelang Bakteriengehalt (*Kokken!*) zeigte. Die deshalb notwendige, laufende mikroskopische Kontrolle der mit Pflanzengewebe beimpften Röhren konnte aber die Gefahr späterer Verunreinigung mit Luftkeimen in sich bergen. Durch eingehende Vorversuche wurde folgendes Verfahren als das sicherste ermittelt.

Methodik: Entnahme der Proben für Ausstrichpräparate erfolgte mittels Platinöse, vorwiegend jedoch mittels Glaskapillaren. Hierzu wird ein etwa 12—15 cm langes Glasröhrchen in der Bunsenflamme zu einer Kapillare ausgezogen, dann so abgerissen, daß das feine, zu einer kleinen Kugel zuge-schmolzene Ende senkrecht abgewinkelt erstarrt. Sofort nach Erkalten wird die Kapillare wie üblich in das Röhrchen eingeführt und das abgewinkelte Endstück in entsprechender Tiefe an Röhrchenwandung oder -boden durch leichten Druck abgebrochen. Dadurch ist eine Entnahme aus einer beliebigen Schicht des Röhrchens (Bodensatz!), ohne Aufschütteln der Kultur, möglich. Mit dieser Methode wurde aus 50 sterilen Bouillonröhrchen ohne Pflanzengewebe zwei Monate hindurch täglich je eine Probe entnommen. Jedes einzelne Röhrchen war also am Schlusse dieses Blindversuches mindestens 60 mal derselben Prozedur unterworfen gewesen. Es erwiesen sich nach insgesamt dreimonatiger Versuchsdauer nur 4 Röhrchen als unsteril (3 mal *Schimmel*, 1 mal *Sporenbildner*). Luftinfektionen sind demnach bei strenger Einhaltung dieser Methodik und sonst sauberer Arbeitsweise in so geringem Maße vertreten, daß sie in meinen Versuchen praktisch keine Rolle gespielt haben können.

In den Hauptversuchen mit Pflanzengewebe erfolgte 4 Wochen hindurch täglich, weitere 4 Wochen lang alle 3—5 Tage und während der restlichen Beobachtungszeit etwa alle 14 Tage eine Probenentnahme zur mikroskopischen Kontrolle. Von jeder Entnahme wurden 3 Ausstriche hergestellt, davon 1 mit Methylenblau nach LÖFFLER, 1 nach GRAM gefärbt und 1 als Reserve ungefärbt aufgehoben.

Von den rund 1500 Kulturen der drei Versuchsobjekte zusammen, die Bakterienwachstum zeigten, wurden nur 37 erst nach mehr als vier wöchiger Beobachtungszeit positiv. Alle anderen ergaben schon innerhalb 4 Wochen unter den angegebenen Versuchsbedingungen Bakterien-

entwicklung. Die Abb. 7 zeigt eine graphische Darstellung der Entwicklungsdauer von 300 positiven *Tomaten*-Isolierungen. Um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen, wurden dabei nur die auf S. 319 beschriebenen *gelben Kokken* berücksichtigt. Wie die Kurven zeigen, wird die überwiegende Mehrzahl der Kulturen innerhalb 4—8 Tagen positiv. Bei Verwendung von 5%iger Natriumbicarbonatlösung erscheint der Gipfel der Kurve etwas nach rechts versetzt, was leicht erklärlich ist. Während die echten Nährlösungen (Bohnenwasser) den Keimen vom Augenblick der Ausimpfung ab reichlich Nährstoffe zur Verfügung stellen, bietet die Natriumbicarbonatlösung den Bakterien erst dann einigermaßen geeignete Wachstumsbedingungen, wenn das eingebrachte Pflanzengewebe entsprechend ausgelaugt ist. Insofern ist also auch die Schnelligkeit des Anwachsens in gewissen Grenzen von der Art des angewandten Nährbodens abhängig. —

In mehreren Versuchsreihen wurde ferner versucht, die Resultate von Keimisolierungen aus gesundem Pflanzengewebe in Beziehung zu bringen zu der herrschenden Wetterlage. Wie die Untersuchungen von

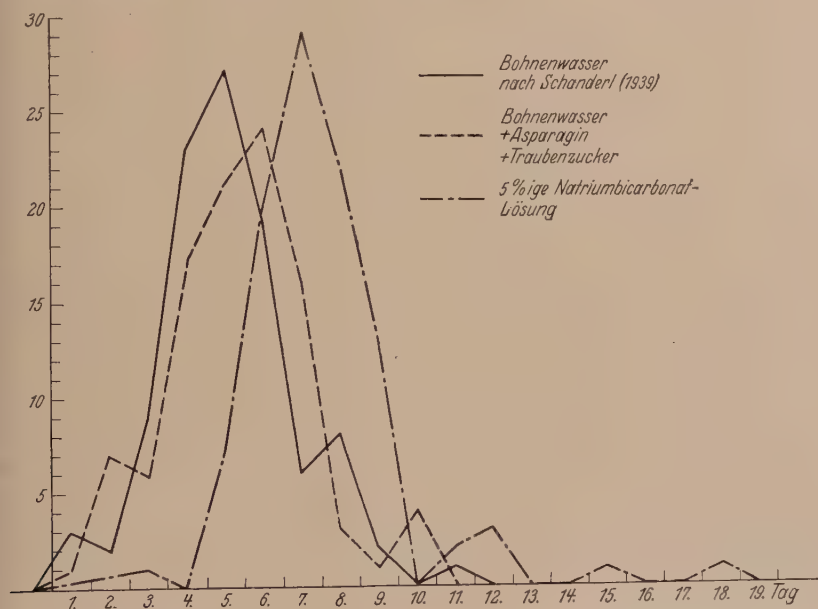


Abb. 7. Einfluß des Nährbodens auf die Entwicklungsdauer (gelbe Kokken aus Tomaten).
Vergl. Text S. 325 ff.

BORTELS, STAPP und BORTELS, sowie eigene, noch unveröffentlichte Versuche ergaben, erfahren die Stoffwechselvorgänge der Bakterien bei nahendem Hochdruckwetter eine Intensivierung, während ein nahendes Tief in entgegengesetzter Weise wirksam ist. Da aber letzten Endes das Wachstum vom Stoffwechsel abhängig ist, war es nicht unwahrschein-

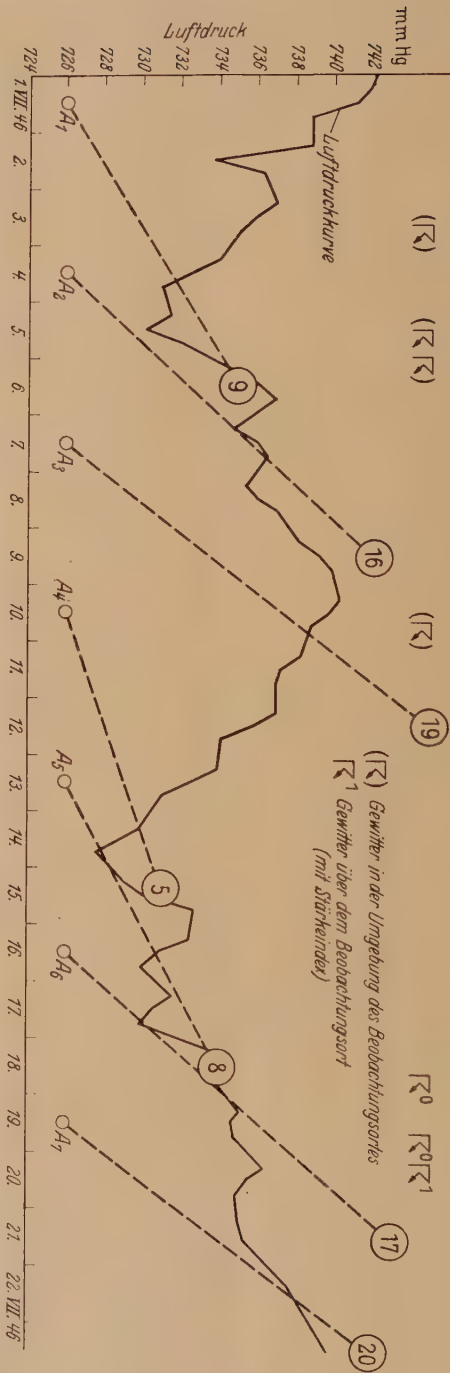


Abb. 8. Einfluß der Wetterlage auf die Entwicklungsgeschwindigkeit der gelben Kokken aus Tomaten. A₁—A₇ jeweiliger Zeitpunkt des Ansatzens der Kulturen (je 25 Bohnenwasserföhrchen mit Tomatenruchfleisch beimpft, vergl. S. 318), (9) etc. Zahl der innerhalb 5 Tagen (25° C) positiv gewordenen Kulturen.

Anm. (20) aus Raumangel in das Diagramm hineinverlegt! Dieser Punkt müßte weiter rechts oben liegen!

lich, daß die Wetterlage auch auf die Schnelligkeit des Anwachsens von Bakterien in Isolierungsversuchen aus Pflanzengeweben einwirke.

Die Abb. 8 zeigt das Ergebnis einer derartigen Versuchsreihe, das eine besonders gute Übereinstimmung von Entwicklungsgeschwindigkeit und Wetterlage veranschaulicht. Ähnliche, z. T. nicht ganz so klare Verhältnisse ergaben mehrere andere Serien. Ohne Anspruch auf allgemeine Gültigkeit der aufgezeigten Gesetzmäßigkeiten zu erheben, soll die Mitteilung dieser Befunde dazu anregen, ganz allgemein bei mikrobiologischen Untersuchungen nach derartigen Beziehungen zu fahnden und sie, wo vorhanden, gebührend zu berücksichtigen.

Besprechung der Ergebnisse und Schlußbetrachtungen zur Symbiose-Theorie Schanderls.

Wie die oben mitgeteilten Befunde zeigen, kann „normales“ Pflanzengewebe Bakteriengehalt in einem solchen Prozentsatz der Fälle aufweisen, wie er bisher — auch von mir — kaum für möglich gehalten wurde. Doch stellt dieses Ergebnis keineswegs eine Stütze der Symbiose-Theorie SCHANDERLS dar. Daß Früchte und Samen häufig im Innern Keime enthalten, ist aus zahlreichen früheren Arbeiten bekannt (z. B. HILTNER, BERNHEIM, NESTLER, CAUDA, MIEHE, NIETHAMMER, ROMWALTER und KIRALY usw.). Ihre Bedeutung als Beweis für die Symbiose-Theorie im Sinne SCHANDERLS verlieren sie aber durch meine Befunde an *Tomaten*früchten. Wären die aus *Tomaten* isolierten Keime wirklich Plasmasymbionten, dann könnte der Standort keinen so weitgehenden Einfluß auf den Keimgehalt, vor allem auf die Artenzahl, ausüben. Besonders schwerwiegend erscheint aber der Nachweis, daß Bakterien von der Oberfläche der Pflanze ohne Verletzung durch den Griffel in das Innere der Früchte gelangen können. Wie aus Tabelle VIII hervorgeht, bestehen dabei gewisse Unterschiede in der Invasionsfähigkeit verschiedener Keimarten. Die Ursachen dieser Erscheinung dürften dieselben sein, die auch die Unterschiede in der Zusammensetzung der epiphytischen Bakterienflora bedingen. Eingehende Vorversuche in dieser Richtung, über die später berichtet werden soll, ergaben, daß die Keimarten auf der Pflanzenoberfläche nicht nur vom Standort (Boden!), sondern auch weitgehend von der Art der Pflanze selbst abhängig sind. Diese ökologische Betrachtung der epiphytischen Bakterienflora gibt aber den Schlüssel zum Verständnis des Dominierens bestimmter Keimarten im Innern von Früchten (z. B. *gelbe Kokken* in *Tomaten*). Je häufiger, vor allem je individuenreicher eine Keimart auf der Oberfläche der Pflanze vertreten ist, umso größer ist die Wahrscheinlichkeit, daß einzelne Keime den Weg ins Innere der Früchte finden. Wie meine völlig negativen *Tomaten*-Infektionsversuche mit *Pseudomonas fluorescens* (Tab. VIII) zeigen, dürften hierbei auch spezifisch hemmende (CAPELLETI und CERUTI) oder auch fördernde Faktoren eine Rolle spielen. Daß auf ähnliche Weise wie Früchte auch deren Samen infiziert werden können, ist verständlich und ist wohl auch die Ursache meiner Befunde an *Vicia faba*. Dabei sind aber andere Möglichkeiten des Eindringens

von Bakterien in Früchte und deren Samen mit zu berücksichtigen. Ich denke hierbei vor allem an die direkte Übertragung durch Insektenstiche (MARCUS), z. B. durch Blattläuse, an das sekundäre Eindringen nach Verletzungen, sowie an Stellen verminderter Abwehrkraft (MARCUS, S. 12), wobei eine besondere Aktivität der sich ansiedelnden Keime noch zusätzlich wirksam sein kann (SÖDING).

Diese Faktoren scheinen jedoch, wenigstens bei meinem Material, gegenüber der Infektion von der Narbe her eine untergeordnete Rolle zu spielen. Untersucht man nämlich statt Früchte und Samen vegetative Pflanzenorgane, zu denen man in diesem Sinne auch *Kartoffelknollen* zählen kann, so ändert sich das Bild sofort wesentlich. Nur ein geringer Prozentsatz der Proben aus frischen derartigen Geweben ergibt positive Kulturen; der weitaus größere Teil derselben bleibt auch bei monatelanger Bebrütung steril. Die Befunde früherer Autoren (FERNBACH, BERTHOLD, WÖLLER usw.) stimmen völlig damit überein. Ja SCHANDERL selbst (1947, S. 30—32, 39—41) nennt, außer *Kartoffeln* und *Karotten*, als Beispiele für Objekte, aus denen man mit Sicherheit Bakterien isolieren könne, ausschließlich Samen und Früchte! Warum aber die „Plasmasymbionten“ gerade aus solchen häufig und regelmäßig zu züchten sein sollen, aus vegetativen Pflanzenorganen dagegen nicht oder doch viel seltener, ist durchaus nicht einzusehen. Ob Früchte, also *Tomaten* und *Kürbisse*, aber auch *Kartoffelknollen* und andere Speicherorgane physiologisch und anatomisch in bezug auf eindringende Keime als „lebende Gewebe“ etwa dem Blatt- oder Stengelparenchym gleichzusetzen sind, erscheint doch sehr fraglich.

Für die Annahme, daß die zu isolierenden Keime aus dem Innern der Zellen selbst stammen, sind nirgends in der Literatur direkte Beweise zu finden. Die von SCHANDERL zitierte Arbeit von HURST und STRONG erbringt lediglich den Nachweis, daß die Chondriosomen aus den Leberzellen der Maus unter bestimmten Bedingungen 5 Passagen hindurch weiterzüchtbar sind und dabei Teilungsvorgänge zeigen. Einer „Regeneration“ zu *Bakterien* im Sinne SCHANDERLS wird aber mit keinem Worte Erwähnung getan. Meine oben mitgeteilten mikroskopischen Untersuchungen an rund 1500 Bakterienkulturen aus Pflanzengewebe legen die Vermutung nahe, daß die Beobachtungen SCHANDERLS über eine „Regeneration der Bakteroiden“ auf einer Täuschung durch morphologisch sehr variable Bakterienformen und auf Mischkulturen beruhen könnten. Ich glaube A. RIPPEL (1948) zustimmen zu können, der sagt: „Die Identität der Chondriosomen mit intrazellulären Bakterien wird lediglich konstruiert: Versuche des Verfassers, den experimentellen Nachweis zu erbringen, scheiterten nach eigener Angabe“.

Auch die Dauer der Beobachtungszeit, der SCHANDERL eine so große Bedeutung beilegt, kann man nach meinen Untersuchungen nicht als Stütze seiner Symbiose-Theorie gelten lassen. Wohl erhielt auch ich bei monatelanger Fortführung negativ verlaufener Kulturen bei dauernder Probeentnahme in einer Anzahl der Röhren doch noch Bakterienwachstum. Ein ganz gleiches Ergebnis brachten aber auch ebenso lange

laufend abgeimpfte Kulturröhrchen ohne Pflanzengewebe! Der Prozentsatz dieser Luftinfektionen, denn um nichts anderes handelt es sich dabei, war in beiden Reihen gleich.

Überblicken wir das Gesamtergebnis der mitgeteilten mehrjährigen Untersuchungen, so ergibt sich folgendes Bild. Der Bakteriengehalt von Früchten und Samen ist mitunter so hoch, daß irgendwelche gesetzmäßigen Beziehungen zweifellos bestehen dürften. Welche dies sind, kann auf Grund der vorliegenden Ergebnisse nicht gesagt werden. Ob die in Früchten und Samen aufgefundenen Keime in Zukunft in erster Linie den Phytopathologen interessieren werden, oder ob den Bakterien innerhalb der Pflanzengewebe eine fördernde Wirkung (Reifung? Samenkeimung?) zukommt, oder ob es sich überhaupt nur um völlig bedeutungslose Zufallsinfektionen ohne jede Wirkung auf die Wirtspflanze handelt, müssen weitere Untersuchungen ergeben. Für eine Symbiose im Sinne SCHANDERLS konnte kein Anhaltspunkt gefunden werden, ja es sprechen die meisten Befunde direkt dagegen.

Auf die Stickstoffbilanz-Versuche SCHANDERLS näher einzugehen, verbietet mir der geringe Umfang des Materials, das ich über diese Fragen sammeln konnte. Auch in dieser Richtung dürfte eine skeptische, dabei aber objektive Haltung angebracht sein. Auch POSCHENRIEDER, dessen noch unveröffentlichte Versuche SCHANDERL (1947, S. 71 bis 72) referiert, sagt: „Trotz meiner positiven Ergebnisse möchte ich noch keine weitgehenden Schlußfolgerungen ziehen. M. E. sind noch zahlreiche und vielseitige Untersuchungen notwendig, um Klarheit in diesem schwierigen und viel umstrittenen Fragenkomplex zu bekommen“¹⁰.

Zusammenfassung.

Es wird über mehrjährige Untersuchungen zur Symbiose-Theorie SCHANDERLS berichtet.

Die Desinfektionsmethoden SCHANDERLS sind trotz ihrer scheinbaren Sicherheit nicht geeignet, das Pflanzenäußere in allen Fällen absolut keimfrei zu machen. Es wurden daher zu den Hauptversuchen Objekte gewählt, die eine sicher sterile Probeentnahme aus dem Innern gestatteten: *Kartoffelknollen*, *Puffbohnen-Hülsen* und *Tomatenfrüchte*.

Mehrere (6—12) Monate gelagerte *Kartoffelknollen* lieferten zu 39% positive Kulturen, von den Knollen erwiesen sich 86% als keimhaltig. Frisch geerntete Knollen ergaben dagegen nur in 7% der Kulturen Bakterienwachstum, die Knollen waren zu 9% im Innern unsteril. Diese, sowie die Ergebnisse von Gefrierversuchen legen den Schluß nahe, daß von außen her Keime durch Wundstellen u. dgl. in das Innere der Knollen eindringen können.

Der höchste Bakteriengehalt von *Vicia faba*-Samen in den Hülsen wurde mit 86% ermittelt, die Kotyledonen erwiesen sich maximal zu 33% bakterienhaltig. Es bestehen große Schwankungen in bezug auf

¹⁰ Briefliche Mitteilung an den Verfasser vom 3. 12. 1947.

den Keimgehalt der Proben je nach dem Boden, auf dem die Pflanzen wachsen. Längere Kultur derselben Pflanzenart auf der gleichen Fläche führt zu einer Steigerung des Bakteriengehaltes der Samen in den folgenden Jahren. Die zu isolierenden Keime stammen nicht aus dem Innern des Gewebes (Zellen!), sondern von der Oberfläche der Samen bzw. der Kotyledonen.

Tomaten lieferten im Durchschnitt 72% bakterienhaltige Kulturen, die Früchte selbst enthielten zu 94% im Innern Bakterien. 78% der isolierten Stämme gehören zur selben Form (identisch oder nahe verwandt mit *Micrococcus coronatus*). Der Standort der Pflanzen beeinflusst nicht nur die Menge, sondern auch die Artenzahl der aus dem Innern isolierbaren Keime.

Infektionsversuche von der Narbe her durch den Griffel zeigten, daß ein Eindringen von Bakterien auf diesem Wege möglich ist. Versuche, die Herkunft der Keime aus dem Zellinnern nachzuweisen, schlugen fehl.

Mikroskopische Untersuchungen an rund 1500 positiven Isolierungen aus Pflanzengewebe ergaben keinen Anhaltspunkt für die von SCHANDERL behauptete „Regeneration“ zu echten Bakterienformen. An Hand von Mikroaufnahmen wird die Möglichkeit einer Vortäuschung solcher Vorgänge durch bestimmte Keimarten erörtert und wahrscheinlich gemacht.

Der Nährboden spielt für den Ausfall von Isolierungen aus Pflanzengewebe nur eine untergeordnete Rolle, ebenso die Beobachtungsdauer. Die Schnelligkeit des Anwachsens von Bakterien aus Pflanzenorganen ist vom Nährboden abhängig; außerdem scheinen Einflüsse der herrschenden Wetterlage zu bestehen.

Die mitgeteilten Befunde liefern keinerlei Stützen für die Symbiose-Theorie SCHANDERLS, sondern machen sie im Gegenteil sehr unwahrscheinlich.

Literatur.

- BERNHEIM, H.: Chemiker-Ztg. 12. Jg., 1321 (1888). — BERTHOLD, E.: Jahrb. wiss. Bot. 57, 387 (1917). — BORTELS, H.: Zbl. Bakt. II. 102, 129 (1940); 104, 289 (1942); 105, 305 (1943). — BURCIK, E.: Planta (Berl.) 30, 683 (1940).
 CAPPELLETTI, C. u. A. CERUTI: Nov. G. Bot. Ital. 46, 339 (1939). — CAUDA, A.: Nov. G. Bot. Ital. 32, 36 (1925). —
 FERNBACH, M. A.: A. d. L'Inst. Pasteur 1888, S. 567. —
 GELINSKY, E.: Zbl. Bakt. I. Orig. 146, 27 (1940).
 HENNIG, K. u. F. VILLFORTH: Biochem. Z. 305, 299 (1940) — HILTNER, L. Landwirtsch. Versuchsst. 34, 311 (1887); Arb. Biol. Abt. RGS. 1902, 3. —
 HURST, C. T. u. I. C. STRONG: Arch. f. Protistenkde. 77, 395 (1932). — HOFFMANN, H. u. H. DEHMEL: Zbl. Bakt. I. Orig. 134, 182 (1935).
 MARCUS, O.: Arch. f. Mikrobiol. 13, 1 (1942). — MEYER, R.: Arch. f. Mikrobiologie 13, 250 (1943). — MEIHE, H. A.: Arch. f. Mikrobiologie 1, 78 (1930).

- NESTLER, A.: Ber. d. Dtsch. Bot. Ges. **17**, 32 (1899); **39**, 230 (1922). —
 NIETHAMMER, A.: Arch. f. Mikrobiol. **10**, 13 (1939); **11**, 73 (1940).
 POTTER, M. C.: Zbl. Bkt. II. **28**, 624 (1910).
 RIPPEL, A.: Die Naturwissensch. **34**, 159, 1947. — RIPPEL, K.: Planta
 (Berl.) **30**, 806 (1940); **32**, 391 (1941). — ROMWALTER, d. Ä., A. u. A. v. KIRÁLY:
 Arch. f. Mikrobiol. **10**, 88 (1940).
 SCHAEDE, R.: Planta (Berl.) **31**, 169 (1940). — SCHANDERL, H.: Die Garten-
 bauwiss. **13**, 406 (1939); Die Gartenbauwiss. **15**, 1 (1940a); Umschau H. 2
 (1940b); Der Züchter 12. Jg., 289 (1940c); Planta (Berl.) **33**, 424 (1943);
 Biolog. generalis (Wien) **17**, 311 (1944); „Botanische Bakteriologie und Stick-
 stoffhaushalt der Pflanzen auf neuer Grundlage“, Stuttgart (1947). —
 SCHANDERL, H. u. H. FREI: Der Dtsch. Weinbau, F. 41, 6. Okt. 1940. — SÖDING, H.
 Ber. Dsch. Bot. Ges. **57**, 465 (1939). — STAPP, C. u. H. BORTELS: Zbl. Bakt. II.
94, 497 (1936). — STÜHRK, A.: Die Obst- u. Gemüseverwertgs. industr. A. H.
42 (1940).
 DI VESTEA: Ann. Inst. Pasteur 1888, S. 670.
 WIGAND, A.: „Das Protoplasma als Fermentorganismus“, Marburg (1888).
 — WÖLLER, H.: Zbl. Bakt. II. **79**, 173 (1929).

(Aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen.)

Über die angebliche Stickstoffbindung durch Nicht-Leguminosen.

Von

August RIPPEL-BALDES.

(Eingegangen am 5. Februar 1948.)

H. SCHANDERL behauptet bekanntlich, daß fast alle höheren Pflanzen befähigt seien, mittels intrazellulär in Symbiose mit ihnen lebender Bakterien elementaren Luftstickstoff zu binden; die Stickstoffbindung solle in den Blättern erfolgen. Auch bei den Leguminosen sei dies der Fall; die Knöllchen seien in dieser Hinsicht nicht nur überflüssig, sondern sogar pathologische Gebilde. Entscheidend sei ferner das Vorhandensein einer gewissen Menge von „Startstickstoff“, sowie die Analyse des Bodens, dessen Stickstoffbilanz u. U. erst die erfolgte Stickstoffbindung in Erscheinung treten lasse. In einer Besprechung des kürzlich erschienenen SCHANDERLSchen Buches¹ habe ich² bereits einige Punkte hervorgehoben, bei denen eine Fehlerhaftigkeit in der Methodik anzunehmen ist. Der nachstehend mitgeteilte Versuch soll möglichst exakt die SCHANDERLSche Behauptung nachprüfen.

Vorher sei noch auf einiges hingewiesen. Auf S. 142 seines Buches werden Versuche mit *Helianthus scaberrimus* und *Helianthus tuberosus* mitgeteilt. Es handelt sich um die schon an anderer Stelle³ S. 446/447 mitgeteilten, die dort aber vollständiger wiedergegeben sind, nämlich mit Stickstoffdüngung im Vergleich zu ungedüngt; in dem Buch ist dagegen nur ungedüngt erwähnt. Die Originalzahlen ergaben aber folgendes:

Düngung	Ernteertrag bei	
	<i>Helianthus scaberrimus</i>	<i>Hel. tuberosus</i>
0	126,4	92,0 g Trockensubstanz
140 mg N	112,2	82,6 g Trockensubstanz
280 mg N	101,7	89,6 g Trockensubstanz

In beiden Fällen war also die Trockensubstanzbildung durch Stickstoffdüngung, bei *Hel. scaberrimus* erheblich, geringer im Vergleich zu den un-

¹ H. SCHANDERL: Botanische Bakteriologie und Stickstoffhaushalt der Pflanzen auf neuer Grundlage. Stuttgart, E. Ulmer 1947.

² A. RIPPEL-BALDES: Besprechung des vorstehend genannten Buches in „Die Naturwissenschaften“, **34**, 159, (1948).

³ H. SCHANDERL Planta. **33**, 424, (1943).

gedüngten Pflanzen. Zu diesen Zahlen* bemerkt SCHANDERL (Planta, S. 446) wörtlich: „Die größere N-Gabe wies das intensivste Blattgrün und die stärkste Massenentwicklung auf, daher bewirkte sie auch jeweils die größte Frisch- und Trockengewichtsernte“. Man steht einer solchen „Beweisführung“, die sich weder um eine richtige Versuchsanordnung noch um eine Versuchsauswertung kümmert, nahezu hilflos gegenüber. Daß im übrigen auch bei SCHANDERL sich die *Leguminosen* deutlich in ihrem N-Haushalt von den übrigen Pflanzen unterscheiden, geht z. B. daraus hervor, daß in den Fällen, in denen eine Zunahme an Boden-Stickstoff festgestellt wurde, es sich um 5 von 9 bei *Leguminosen* (= 55,3%) handelt, bei *Kompositen* dagegen um nur 4 von 28 (= 14,3%).

Ein weiteres Beispiel über einen Kartoffelversuch interessiert hier ebenfalls, da es sich um die auch von mir verwendete Versuchspflanze handelt. Es wurden dort (Planta, S. 446/447) Knollen im Frischgewicht von 65 bis 133.0 g ausgelegt und einheitlich zur Aufstellung der Bilanz der aus seinen Angaben zu erreichende Wert von etwa 140 mg N je 100 g Frischgewicht (geringfügige Abweichungen sind wohl auf die Verwendung des Rechenschiebers zurückzuführen) angenommen, der offenbar aus einer Analyse stammt. Dabei zeigen die unten in Tabelle I angeführten eigenen Zahlen, daß bei sehr ausgeglichener Knollengröße (62.6 bis 76.9 g) und reiner Kartoffelsorte der N-Gehalt so schwankt, daß je 100 g Frischgewicht 252.3 bis 424.4 mg N gefunden wurden, also Unterschiede von fast 100%. Es wird niemand behaupten können, daß man bei solcher Methodik auch nur einigermaßen überzeugende Beweise beibringen könnte.

So sind alle von SCHANDERL zum Beweis der Stickstoffbindung durch Nicht-Leguminosen mitgeteilten Versuche mit zum Teil sehr groben Mängeln behaftet; es möge aber genügen, auf die erwähnten Beispiele hingewiesen zu haben; im übrigen vergleiche man weiter meine kritischen Bemerkungen in den „Naturwissenschaften“.

Eigener Versuch.

Versuchsanstellung. Der Versuch wurde mit *Kartoffeln* ausgeführt und zwar in 10facher Wiederholung. Zu dem „Startstickstoff“, den die Kartoffelknollen ja selbst besitzen, wurden noch 47.7 mg N in Form von Ammonphosphat gegeben; alles weitere geht aus der nachstehend beschriebenen Versuchsanordnung hervor.

Es wurden MITSCHERLICH-Gefäße verwendet, die mit je 8.0 kg Freienwalder Quarzsand gefüllt wurden, wie wir ihn bereits zu zahlreichen Pflanzenversuchen mit Erfolg verwendet hatten. Je Gefäß wurde noch eine Beimischung von 100 g Gartenerde gegeben. In jedes Gefäß wurde am 8. IV. 1943 eine Knolle der *Sorte Sabina* ausgelegt, die uns Herr Kollege TORNAU vom Institut für Pflanzenbau freundlichst überließ, wofür auch an dieser Stelle bestens gedankt sei. Nach dem Einpflanzen wurde mit $\frac{1}{2}$ Liter Wasser je 0,1 g KH_2PO_4 und K_2SO_4 gegeben. Am 16. IV. erhielt jedes Gefäß noch in 250 ccm Wasser 0,037 g Natriummolybdat, am 6. V. in 250 ccm Wasser 47,8 mg Stickstoff als $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ und wieder 0,1 g K_2SO_4 , am 25. V. wiederum 0,2 g K_2SO_4 und 0,1 g KH_2PO_4 , dazu 0,1 g MgSO_4 . Die allmähliche Salzgabe wurde gewählt, um nicht von vornherein zu stark mit Salzen zu überschwemmen. Von da ab

wurde so viel Wasser gegeben, daß eben ein wenig durchlief; das Sickerwasser wurde natürlich stets zurückgegeben.

Nachdem schon vorher die ersten kleinsten Blättchen vergilbt waren, vergilbte am 30. VI. das erste größere Blatt. Danach traten die Anzeichen des Stickstoffmangels auch bei anderen Pflanzen ein, allmählich verstärkt durch trockene Stellen an den Blatträndern. Geerntet wurde am 12. VII. 1943, nachdem die Pflanzen seit Wochen keinerlei Fortschritt in ihrem Wachstum gezeigt hatten. Vorher vergilbte und abfallende Blättchen wurden aufgehoben und mit der endgültigen Ernte zur Stickstoffanalyse vereinigt.

Die Wurzeln wurden so geerntet, daß der Sand erst durch vorsichtiges Klopfen größtenteils entfernt wurde. Darauf wurde der Wurzelballen in 500 ccm Wasser in einem Glaszylinder durch Auf- und Abtauchen gut abgespült, daß der Sand heruntersank. Er wurde samt dem Waschwasser zu dem Sand des Kulturgefäßes gegeben, ebenso die gegebenenfalls im Untersatz noch befindliche Menge an Sickerwasser. Durch Abtrocknenlassen vor der Ernte wurde zu starke Feuchtigkeit des Sandes vermieden. Der ganze feuchte Sand des Gefäßes wurde in einer Zinkwanne gründlich durchgemischt, davon etwa 1 kg zur Analyse entnommen und getrocknet.

Die Wurzeln wurden noch einmal gründlich ausgewaschen, durch ein Haarsieb gegeben, gut ausgedrückt und zusammen mit der oberirdischen Substanz als Frischgewicht gewogen. Aller Sand war aus den Wurzeln entfernt und konnte bei der Analyse nicht stören. Erwähnt sei noch, daß die unterirdische Pflanzenmasse je Gefäß 3—4 kleine Knollen trug, dazu mehrere kleine Knollenansätze.

Die Kulturen wurden mit Leitungswasser gegossen, das stickstofffrei ist, während unser dest. Wasser meist Spuren von Ammoniak enthält. Sie standen auf fahrbaren Wagen und wurden bei Nacht und bei Regenwetter in die Glashalle geschoben. Übrigens spielt der Stickstoffgehalt des Regenwassers innerhalb der Schwankungen kaum eine Rolle.

Stickstoffanalysen. Bei der Vornahme der Analysen trachtete ich vor allem danach, den „Multiplikationsfaktor“ zu verringern, d. h. große Mengen zu analysieren, und ferner Anfangs- und End-Analysen so vorzunehmen, daß der Blindwert in beiden Fällen gleich war.

Vom Sand, dessen Stickstoffgehalt im Mittel zu 0,78 mg in 100 g gefunden wurde, wurden je 250 g mit 150 ccm Schwefelsäure in 1 Liter-Aufschlußkolben unter Zusatz von Aufschlußgemisch ($K_2SO_4 + Se$) und einem Kupfersulfat-Kriställchen 2 Tage lang auf kleiner Flamme erhitzt. Danach wurde die Schwefelsäure vorsichtig in einen anderen ebensolchen Kolben abgegossen und viele Male mit etwa 850 ccm Wasser in kleineren Portionen unter kräftigem Umschwenken ausgewaschen; alles wurde natürlich vereinigt und dann das Wasser weggekocht und aufgeschossen. Danach wurde in einem 500 ccm Meßkolben übergespült, aufgefüllt und 100 ccm destilliert. Der Stickstoffgehalt wurde somit in 50 g Ausgangsmaterial bestimmt, was jedenfalls den „Multiplikationsfaktor“ gegenüber etwa 5 g Ausgangsmaterial auf $\frac{1}{10}$ herabsetzt.

Dieses „Voraufschließen“ und Überspülen mit nachfolgendem Vollaufschluß war notwendig, da der Quarzsand beim Kochen derart stößt, daß er selbst nicht voll erhitzt werden kann. Um dem Einwand vorzubeugen, daß dieses Verfahren ungenügende Werte ergäbe, führten wir eine Bestimmung

durch, bei der zu 250 g Sand 100 g Erde hinzugegeben wurden und mit der Bestimmung im Sand und in Erde jeweils allein verglichen wurde, wobei die Erde, die gleiche, die zu dem Zusatz zu den Kulturgefäßen benutzt war, unmittelbar aufgeschlossen wurde, ebenfalls mit 150 ccm Schwefelsäure. Das Ergebnis war:

Blindwert	Sand allein	Erde allein	Sand + Erde
0,71	1,21	33,08	33,01
	<u>0,71</u>	<u>0,71</u>	<u>0,71</u>
	0,50	32,37	32,30

Zusammen 32,87

Zur Stickstoffbestimmung 100 ccm des auf 500 ccm
aufgefüllten Aufschlusses.

Sand allein und Erde allein ergaben also 32,87 mgN gegen 32,30 bei der gemeinsamen Bestimmung. Der geringe Unterschied von 0,57 mg liegt innerhalb der Fehlergrenzen. Dabei ist noch zu berücksichtigen, daß bei dem zur Kultur verwendeten Sand-Erde-Gemisch (100 g Erde je 8000 g Sand) nur 3,0 g Erde auf 250 g Sand entfielen, welche Menge zum Aufschluß verwendet wurde, bei obiger Bestimmung hingegen 100 g Erde auf die gleiche Sandmenge. Obwohl also bei dieser großen Menge von Erde das Ausspülen des Sandes sehr erschwert war, war das Ergebnis fast das gleiche wie bei der getrennten Analyse. Anders ausgedrückt: Auf unsere Versuchsmischung angewendet würde der obige Unterschied von 0,57 mg, vorausgesetzt, daß er wirklich ist, auf 50 g Sand + 20 g Erde (die zur Destillation verwendete Menge = $\frac{1}{5}$ des Aufschlusses) einen Fehler von 1,7% ausmachen, auf das ganze Gefäß mit dem zur Kultur verwendeten Substrat mit rund 500 mg Stickstoff also rund 8,5 mg, was zweifellos die Ergebnisse nicht beeinflussen kann; dieser Wert ist nur ein Bruchteil des mittleren Fehlers (s. S. 339). In Wirklichkeit dürfte er noch geringer sein, da, wie schon gesagt, die geringe Beimengung von Erde im Kultur-Substrat sich natürlich erheblich besser ausspülen läßt.

Von der dem Sand beigemischten Erde wurde die ganze je Gefäß gegebene Menge von 100 g mit 150 ccm Schwefelsäure auf einmal aufgeschlossen, der Aufschluß auf 500 ccm aufgefüllt und 100 ccm davon destilliert. Auch hier wurde natürlich der Blindwert abgezogen. Der Multiplikationsfehler ist sehr gering, da so $\frac{1}{5}$ der je Gefäß zugegebenen Menge an Erde in der Stickstoffbestimmung unmittelbar erfaßt wurde.

Von den zur Bestimmung des Ausgangs-Stickstoffs dienenden Knollen wurde je 1 Knolle in frischem Zustande mit 150 ccm Schwefelsäure aufgeschlossen, davon, nach Auffüllen auf 500 ccm, 100 ccm abdestilliert. In gleicher Weise wurde die gesamte Ernte je Gefäß (oberirdische Substanz + Wurzeln + alte und neue Knollen) mit 150 ccm Schwefelsäure aufgeschlossen und in gleicher Weise destilliert. Auch hier ist der Blindwert abgezogen. Im übrigen sind auch hier alle möglichen Fehlerquellen der Stickstoffbestimmung bei Ernte und Ausgangsmaterial gleich.

Die Blindbestimmung wurde mit 150 ccm Schwefelsäure, Aufschlußgemisch und Destillation in gleicher Weise ausgeführt wie die Aufschlüsse

mit Boden- und Erntematerial. Sie ergab vor und nach dem Versuch den gleichen Wert.

Um nochmals hervorzuheben: Wir haben somit bei Ausgangs- und Erntematerial die gleichen Mengen mit den gleichen Mengen an Reagentien aufgeschlossen und destilliert, haben stets den Blindwert abgezogen und begehen somit bei allen Bestimmungen höchstens den gleichen (unkontrollierbaren) Fehler, sodaß wir eine einwandfreie Bilanz aufstellen können.

Das Ammoniak des zugegebenen Ammoniumphosphates wurde durch direkte Destillation bestimmt. Auf Ammoniak und Nitrat im Ausgangsmaterial (Sand + Erde) brauchten wir keine Rücksicht zu nehmen, da die qualitativen Proben negativ ausfielen. Hingegen wurde nach Abbruch des Versuches im Boden-Material Ammoniak- und Nitrat-Stickstoff bestimmt, der erste durch direkte Destillation, Nitrat-Stickstoff nach vorheriger Reduktion nach ULSCH mit *ferrum reductum*, Destillation und Differenz zu dem direkt gefundenen Ammoniak-Stickstoff. Sollten im Ausgangsmaterial doch Spuren von Ammoniak- und Nitrat-Stickstoff vorhanden gewesen sein, so würden wir also höchstens zu ungünstig rechnen und die Bilanz zu Gunsten einer Stickstoffzunahme beeinflussen.

Versuchsergebnisse. Tabelle I gibt zunächst die Zahlen des Frischgewichtes der zur Stickstoffanalyse benutzten und der ausgelegten Knollen. Es waren 20 Knollen von annähernd gleichem Gewicht ausgewählt; die leichteste wog frisch 62,6, die schwerste 76,9 g. Die Knollen wurden nach fallendem Gewicht geordnet⁴ und abwechselnd je 1 Knolle zum Versuch ausgelegt und zur Stickstoffbestimmung analysiert. Auf die ungeheuren Schwankungen im Stickstoffgehalt der Knollen, die aus Tabelle I hervorgeht, wurde oben bereits hingewiesen. Je Knolle beträgt der absolute Unterschied zwischen dem höchsten und niedrigsten Wert (298,3 und 167,6 mg N) 130,7 mg N. Ursprünglich glaubte ich, an Hand der Kontrollanalysen eine Kurve des Stickstoff-

Tabelle I. *Frischgewicht und Stickstoffgehalt der Kartoffelknollen.*

Frischgewicht		mg Stickstoff je 100 g Frischgewicht	mg Stickstoff je Knolle (Blindwert 3,6 mg N abgezogen)
ausgelegte Knollen	analysierte Knollen		
76,9	74,5	272,9	203,3
72,9	74,0	403,1	298,3
70,9	72,1	365,2	263,3
69,0	70,0	252,3	167,6
66,7	69,9	366,6	255,8
66,2	66,8	339,7	226,9
65,4	66,5	424,4	282,2
65,3	65,8	257,3	169,3
63,8	65,1	354,5	230,8
62,6	63,9	341,0	217,9
			Mittel
			231,5 ± 41,9

⁴ Mit Ausnahme der beiden ersten Knollen, bei denen die Reihenfolge vertauscht ist, um das geringfügige Mindergewicht der ausgelegten Knollen etwas auszugleichen.

gehaltes der Knollen, diese nach Größe geordnet, aufstellen und mit dem Stickstoffgehalt der Ernten vergleichen zu können. Diese Kurve hätte dann annähernd in einem bestimmten Abstand über jener verlaufen müssen. Wie man sieht, ist das jedoch nicht möglich. Vielleicht würde das Verfahren möglich sein, wenn man ausgesuchte Knollen teilt, die eine Hälfte analysiert und die andere auslegt. Darüber müßten jedoch besondere Versuche angestellt werden.

Rechnet man mit dem Mittelwert von 231,5 mg N, so hat man, vorausgesetzt, daß die Versuchsknollen den gleichen Mittelwert ergeben hätten, immerhin einen mittleren Fehler von $\pm 41,9$.

Tabelle II gibt weiterhin die Zahlen des Frischgewichtes der Ernten, deren Stickstoffgehalt und den Stickstoffgehalt des Bodenmaterials nach der Ernte (noch ohne Berücksichtigung des Nitrat-Stickstoffs). Die Anordnung der Zahlen ist die gleiche wie in Tabelle I; sie sind also nach der Ausgangsgröße der Knollen geordnet.

Tabelle II. *Ernte und Stickstoffgehalt der Kartoffeln und des Bodens.*

Nr.	Frischgewicht der Ernte	In Ernte	mg Stickstoff (in Klammern mg % N)	
			Im Boden	In Ernte + Boden
1	233,0	218,3	278,5 (3,44)	496,8
2	242,0	234,4	208,9 (2,58)	443,3
3	233,0	284,4	265,5 (3,28)	549,9
4	234,0	294,0	193,8 (2,40)	487,8
5	229,0	245,1	265,5 (3,28)	510,6
6	210,0	219,0	265,5 (3,28)	484,5
7	234,0	250,8	278,5 (3,44)	529,3
8	200,0	203,9	265,5 (3,28)	469,4
9	234,0	250,3	231,5 (2,86)	481,8
10	186,0*)	213,2	289,8 (3,58)	503,0
	Mittel	241,3	254,3	495,6
	Mittlerer Fehler**)	$\pm 28,4$	$\pm 30,3$	$\pm 28,6$

*) Pflanze rollkrank!

**) Mittlerer Fehler der Einzelbeobachtung

$$= \sqrt{\frac{\text{Summe der Quadrate der Abweichungen}}{\text{Zahl der Fälle}}}$$

Der Ertrag zeigt keinen Zusammenhang mit der Knollengröße. Die zuletzt aufgeführte Pflanze war rollkrank. Die Stickstoffmengen in der Ernte zeigen etwas geringere Schwankungen als die zu Versuchsbeginn analysierten Knollen. Vergleicht man die Mittelzahlen, ohne Rücksicht auf die Schwankungen, so hätte der Stickstoffgehalt der Ernte gegenüber der Aussaat nur um 10 mg zugenommen, obwohl je Gefäß 47,7 mg Stickstoff als Ammoniumphosphat-Stickstoff gegeben waren. Aller-

dings lassen die großen Schwankungen die Frage offen, wieviel dieses Stickstoffs in Wirklichkeit aufgenommen war.

Jedenfalls bestimmten wir noch den Ammoniak-Stickstoff im Boden nach der Ernte und erhielten im Mittel 38,5 mg Ammoniak-Stickstoff je Gefäß, eine Zahl, die somit zusammen mit dem gefundenen Mehr von 10 mg Stickstoff genau die gegebene Menge an Ammoniak-Stickstoff ergeben würde. Die Kartoffel hätte also den gegebenen leicht assimilierbaren Stickstoff sehr schlecht ausgenützt. Hierzu ist zu sagen, daß die Kartoffel für Gefäßversuche eine außerordentlich ungünstige Pflanze ist. Die Wurzelbildung ist gering, und bei weitem nicht der ganze Boden ist durchwurzelt.

Die Analyse der einzelnen Böden nach der Ernte zeigt ebenfalls erhebliche Schwankungen, wie Tabelle II zeigt. Die Extremwerte liegen um 96,0 mg N auseinander. Bis zu einem gewissen Grade entspricht der geringeren Stickstoffernie in der Pflanzensubstanz der höhere im Boden und umgekehrt, wenn sich auch keine völlig einheitliche Reihe zeigt, was nach den großen Schwankungen auch gar nicht erwartet werden kann.

Wir wollen nun die Gesamtbilanz des Stickstoffs bilden (Tabelle III). Die Bilanz geht also fast restlos auf. Es wurde lediglich ein „Mehr“ an

Tabelle III. Gesamtbilanz an Stickstoff.

Gegeben mg N je Gefäß in den Knollen	231.5 mg N
im Sand* (8000 g)	62.4 " "
in der Erde* (100 g)	163.1 " "
im Ammoniumphosphat	47.7 " "
Zusammen gegeben	504.7 mg N
Gefunden wurden nach der Ernte	
in den Pflanzen	241.3 mg N
im Boden (8100 g)	254.3 " "
dazu Nitrat-N	14.2 " "
Zusammen	509.8 mg N

* Die Bestimmung erfolgte einmal vor Versuchsbeginn, ein zweites Mal nach Versuchsabbruch: beide Werte stimmten befriedigend überein. Die obigen Zahlen sind die Mittelwerte.

Stickstoff gefunden von 5,1 mg. Hierbei haben wir noch zu ungünstig gerechnet, da bei dem Aufschluß auch ein Teil des Nitrat-Stickstoffs erfaßt sein konnte, wir aber den ganzen gesondert bestimmten Nitrat-Stickstoff einsetzten.

Aber davon abgesehen: Dieses „Mehr“ von 5,1 mg N ist nur etwa $\frac{1}{6}$ des mittleren Fehlers der Gesamt-Stickstoffmenge in Tabelle II (28,6 mg N). Dabei ist dieser mittlere Fehler aus den Einzelwerten der jeweiligen Summen von Ernte + Boden berechnet. In Wirklichkeit müßte er nach dem Fehlerfortpflanzungsgesetz aus beiden für Ernte (28,4 mg N) und Boden (30,3 mg N) ermittelten Werten als Wurzel aus

der Summe der Quadrate berechnet werden, womit er sich auf 41,5 mg N stellen würde. Die Bilanz geht also, wie schon gesagt, restlos auf, und eine weitere statistische Behandlung wird danach vollkommen überflüssig.

Daß die Übereinstimmung in Einnahme und Ausgabe so gut ist, kann natürlich reiner Zufall sein, da die Schwankungen einen weit größeren Spielraum ließen, innerhalb dessen Werte möglich gewesen wären, die keinen Schluß in irgend einer Richtung zugelassen hätten. Es kann allerdings auch durch die Verwendung der 10 Parallel-Kulturen ein weitgehender Ausgleich der verschiedenen Fehlerquellen eingetreten sein.

Nach der SCHANDERLSchen Auffassung wäre als Hauptargumentation gegen die vorliegenden Versuche die zu geringe Menge an „Startstickstoff“ im Boden anzusehen. Hierzu ist zu bemerken: Warum benötigen die *Leguminosen* keinen Startstickstoff, sondern gedeihen auf stickstofffreiem Substrat? Es ist ferner zu beachten, daß Vergrößerung der Menge des Bodenstickstoffs auch die Fehlermöglichkeiten (Unsicherheit der Bilanz) vergrößert; man vergleiche dazu im übrigen meine eingangs erwähnten kritischen Bemerkungen.

Vor allem ist aber darauf hinzuweisen, daß der bei dem vorliegenden Versuch vorhandene „Startstickstoff“ ja in der Knolle selbst steckt (167,6 bis 298,3 mg N je Knolle). Das sind Werte, die in der gleichen Größenordnung liegen wie bei den meisten der gesamten Stickstoffmengen, die sich bei SCHANDERLS Versuchen in der oberirdisch geernteten Pflanzenmasse als von den Pflanzen während des Versuches assimilierten Stickstoff ergeben. Und SCHANDERL selbst gibt S. 144 einen Versuch auf Hohenbockaer Sand an (weitere derartige Versuche auch mit S. 145), in dem für *Senecio Jacobaea* als Versuchspflanze, bei 169 mg N je 6500 g Sand ein N-Gewinn von 64 mg erzielt worden sein soll, bei nur 48 mg N in der geernteten Pflanzenmasse. Die bei meinen Versuchen verwendete Sandmenge von 8000 g + 100 g Erde + Ammonphosphat enthielt 273,2 g N, also auf 6500 (zum Vergleich mit obigen Zahlen) umgerechnet, 209 g N. Die Verhältnisse sind also bei meinem Versuch, vom Boden aus gesehen, mindestens so günstig wie in dem SCHANDERLSchen Versuch, in Wirklichkeit aber viel besser, da bei SCHANDERL die Aussaat der Versuchspflanze nur 8 mg N brachte, bei meinem Versuch aber, wie gesagt, 167,6 bis 298,3 mg N. Beobachtet man ferner, daß der mit der Knolle gegebene „Startstickstoff“ doch in viel höherer Konzentration von vornherein zur Verfügung steht als wenn er im Boden steckt und von der Pflanze erst, u. U. nur zu einem sehr geringen Teil, aufgenommen werden müßte, so ist ohne weiteres klar, daß den Knollen genügend „Startstickstoff“ zur Verfügung gestanden haben müßte⁵.

⁵ Herr Prof. Dr. LÜDECKE teilt hierzu noch mit: Die Versuchsstation Bernburg führte in den Jahren 1942—44 ebenfalls Stickstoffbilanzversuche mit verschiedenen Nicht-Leguminosen durch, und zwar unter Benutzung eines von Herrn Professor SCHANDERL unmittelbar übersandten, nach ihm stickstoffarmen Vegetationssandes. Das Ergebnis konnte infolge der Kriegsergebnisse leider nicht mehr analytisch ausgewertet werden, doch ließen die

Zusammenfassend kann also festgestellt werden, daß eine Stickstoffbindung bei der *Kartoffel* nicht nachgewiesen werden konnte. Auch für andere Pflanzen (von *Leguminosen* und einigen anderen abgesehen) hat die praktische Erfahrung keinerlei Hinweise in dieser Richtung ergeben, und die insbesondere von SCHANDERL mitgeteilten Versuche sind methodisch gänzlich unzulänglich.

Vegetationsbeobachtungen eindeutig erkennen, daß nach Aufbrauchen des sogenannten „Startstickstoffes“ sämtliche nicht mit einer ausreichenden Stickstoffgabe gedüngten Pflanzen stärksten Stickstoffmangel aufwiesen. Dies zeigte sich nicht nur an der hellgrünen Farbe der Blätter, sondern vor allem an dem entsprechend dem Gesetz von Minimum sehr stark unterschiedlichen Höhenwachstum der verschiedenen Pflanzen, insbesondere bei *Helianthus tuberosus*. In einer Reihe von Farbaufnahmen wurde dieses besonders festgehalten. — Diese Versuche würden somit, wenn die Analysen hätten durchgeführt werden können, die vorliegenden Ergebnisse mit Kartoffeln weitgehend bestätigen bzw. ergänzen.

(Aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen.)

Über einige Fehlerquellen bei der Prüfung von Pflanzenteilen auf das Vorkommen von Bakterien.

Von

WILHELM FISCHER.

(Eingegangen am 21. Februar 1948.)

In seinem Buche sagt SCHANDERL¹, daß seine eigenen Behauptungen „mit der Versuchsmethodik stehen oder fallen werden“. Es erschien darum wesentlich, gerade die STÜHRKSchen² Versuche zu wiederholen und zu ergänzen, da bei ihnen unbedingte Asepsis zweifelhaft erschien und auch keine der in solchem Falle unerläßlichen Blindserien angeführt sind.

STÜHRK sterilisierte im Dampftopf oder Autoklaven Samen von *Erbse* und *Bohne* mit Wasser in wie üblich mit Wattebausch verschlossenen Reagenzgläsern. Bei den Röhrchen, die nach Bebrütung klar blieben, also makroskopisch keine Bakterienentwicklung zeigten, wurden die Samen unter angeblich vollkommen aseptischen Bedingungen mit einem Glasstab zerstoßen, wobei zu einem hohen Prozentsatz der Fälle Entwicklung von *sporenbildenden Bakterien* erfolgte, kenntlich durch Trübung und Kahmhautbildung in den Röhrchen. Die Ursache dieser Erscheinung wird in Anlehnung an die SCHANDERLSche Theorie durch das *intrazelluläre* Vorkommen von zu *Bakterien* regenerierbaren Plasmasymbionten zu erklären versucht, während umgekehrt, wie schon gesagt, die STÜHRKSchen Ergebnisse von SCHANDERL¹ (S. 66—67) als eine Hauptstütze seiner Anschauungen angeführt werden.

I. Fehlerquellen der Manipulation des Zerstoßens von Samen usw.

Bei der genauen Wiederholung der STÜHRKSchen Versuche (soweit angegeben und kontrollierbar) wurde sowohl bei im Dampftopf als auch im Autoklaven sterilisierten frischen *Erbsen* ebenfalls fast hundertprozentig Wachstum von *Sporenbildnern* nach dem Zerstoßen mit dem Glasstab beobachtet (Tab. II, 1—2). Jedoch bestand insofern ein Unterschied, als nach dem Sterilisieren im Dampftopf weitaus weniger Röhrchen klar blieben (also makro-

¹ H. SCHANDERL: Botanische Bakteriologie und Stickstoffhaushalt der Pflanzen auf neuer Grundlage. Stuttgart, E. Ulmer, 1947. Siehe dort auch weitere Literatur.

² A. STÜHRK: Die Obst- und Gemüseverwertungsindustrie. Ausg. A. Nr. 42 vom 16. 10. 1941.

skopisch keine Bakterienentwicklung erkennen ließen) als bei STÜHRK, wobei die Entwicklung z. T. erst nach längerer Bebrütung zu erkennen war; oder die Infektion konnte erst dadurch nachgewiesen werden, daß von allen Röhrenchen, auch den klar gebliebenen, Abimpfungen in jeweils 3 Parallelen auf Fleischwasserbouillon gemacht wurden, wobei nur sehr selten in allen drei Röhrenchen Wachstum zu beobachten war. Hierauf wird im II. Abschnitt näher eingegangen.

Hier sollen zunächst die Fehlerquellen der Manipulation des Zerstoßens bei Blindserien (Nährlösung ohne Samen) der Kürze und Übersichtlichkeit wegen im Zusammenhang besprochen werden, obwohl diese zeitlich immer mit entsprechenden Hauptversuchen (bei Gegenwart von Samen usw.) durchgeführt wurden.

Daß man mit gut geglühter Platinnadel oder -öse selbst große Serien fast 100prozentig ohne Fremdinfektion impfen kann, ist allgemein bekannt (ausgewertete eigene große Impfserien ergaben Infektionsraten $< 0.5\%$). Genau so bekannt ist aber auch aus Erfahrung, daß bloßes Eintauchen des Kopfes des Nadelhalters die Infektionsmöglichkeit erhöht (wie vorher, Infektionsrate bis 5%).

Bei den folgenden Blindserien (klare Nährlösung ohne Samen) wurde die Manipulation streng wie im Hauptversuch durchgeführt, sozusagen unter Normung aller Einzelheiten des Gerätes, des Abflammens, der Bewegungsgröße und -zahl, sowie der Dauer des Stoßens, des Haltens der Röhrenchenöffnung in der Flamme, des Ortes der Handlung usw., um möglichst vergleichbare technische Grundlagen zu bekommen.

Eine Serie mit 3 cm Probacit-Bouillon (Maggis Probacit als Ersatz für Fleischwasser) zeigte eine relativ geringe Zahl von Infektionen (vgl. für alle Blindserien die Tab. I). In Röhrenchen mit 10 und 15 cm zeigte sich eine wesentliche Erhöhung der infizierten Röhrenchen. Die Probacit-Bouillon ist kein optimaler Nährboden. Bei Verwendung von Fleischwasserbouillon und Erbsenauszugswasser³ zeigte sich eine weiter erhöhte Infektionswahrscheinlichkeit; sie lag am höchsten bei Zugabe von 0.1% Agar. Damit ergibt sich vergleichsweise dieselbe Schwierigkeit der Manipulation wie bei den mit Samen beschickten Röhrenchen. Infolge des Anhaftens der mehr oder weniger konsistenten Gewebsmasse ist es bei diesen bedeutend schwieriger, sauber zu arbeiten, und nach jedem Zerstoßen ist auch eine mechanische Reinigung des Glasstabes (Abputzen, Abspülen) nötig.

Die vorgenannten Blindserien unter Benutzung eines Glasstabes zum Stoßen zeigten demnach (Tab. I), daß mit einer Infektionswahrscheinlichkeit bis zu über 60% zu rechnen ist: sehr häufig liegen die Werte zwischen $30-50\%$. Natürlich können diese Zahlen nur als Vergleichswerte gelten, da schon eine geringe Abweichung in methodischen Umständen und die verschiedene Zusammensetzung des Nährbodens bedeutende Verschiebungen ergeben.

Die Ergebnisse unter 8.—15. in Tab. I zeigen, daß Vornahme der Manipulation an Orten verschiedener Luftkeindichte (Impfkasten, Impfraum, N-Bestimmungsraum, Laboratorium) ohne wesentlichen Einfluß auf die Infektionsrate blieben. Daraus ist zu folgern, daß einer direkten

³ Entsprechend der Angabe bei SCHANDLER für Bohnenauszugswasser hergestellt.

Tabelle I. Beobachtungen in Blindserien.

Nr.	Nährlösung und Behandlung der Röhrchen	Zahl der Röhrchen	% gewachsen	Wiederholungen
1	3 ccm Bouillon (Probacit) mit Glasstab	50	8	4*), 12
2	10 ccm Bouillon (Probacit) mit Glasstab	50	16	22
3	15 ccm Bouillon (Prabacit) mit Glasstab	50	10	24
4	10 ccm Fleischwasserbouillon mit Glasstab	48	25	28
5	10 ccm Erbsenauszugwasser mit Glasstab	50	26	20
6	10 ccm Fleischwasserbouillon + 0,1% Agar mit Glasstab	20	40	55, 65, 40
7	10 ccm Erbsenauszugwasser + 0,1% Agar mit Glasstab	20	35	50
8	wie 6. Manipulation im Impfkasten	20	40	50
9	wie 6. Manipulation im Impfraum	10	40	
10	wie 6. Manipulation im N-Bestimmungsraum	10	50	
11	wie 6. Manipulation im Laboratorium	20	45	60, 45, 70
12	wie 4. im Impfkasten 20 Min. offen stehenlassen	20	5	
13	wie 4. im Labor 20 Min. offen stehenlassen	20	15	(z. T. Pilze)
14	10 ccm $\frac{1}{2}$ Würze in Labor offen stehenlassen	20	20	(Pilze!)
15	10 ccm $\frac{1}{2}$ Würze, Manipulation mit Glasstab	20	40	(Sporenbildner)
16	wie 6. Manipulation mit Glasstab Alk. 70 proz. abbrennen	10	60	10, 30
17	wie 6. Manipulation mit Glasstab Spiritus abbrennen	10	40	30, 10
18	wie 6. Manipulation mit Glasstab Spiritus, stark glühen	16	12,5	31
19	wie 6. Manipulation mit Glasstab Spiritus, stark glühen, warten, bis abgekühlt.	20	20	25
20	wie 6. Manipulation mit Metallstab — Spiritus, sehr stark glühen	20	5	0, 0
21	wie 20. Wiederholung	18	0	
22	wie vorher, stärkere u. längere Bewegung	20	10	5
23	Wiederholung, Spiritus nur abbrennen lassen	20	55	

*) Für die Wiederholungen ist die Zahl der Parallelen nicht besonders angegeben (Zahl schwankte zwischen 50 bis 10).

**) Nur Serien zwischen Strichen sind gleichzeitig durchgeführt also direkt vergleichbar.

Luftinfektion (Einfallen von Keimen) keine Bedeutung zukommt. Auch das ausschließliche Vorkommen von *Sporenbildnern* und das Fehlen der sonst häufigen *Luftkokken* und *Pilze* spricht dafür, ebenso die Beobachtungen beim offenen Stehenlassen von Röhren (Tab. 1, 12—14), wobei die Infektionsrate vergleichsweise äußerst niedrig liegt und andererseits sowohl in Fleischwasserbouillon wie auch in $\frac{1}{2}$ -Würze *Pilze* und auch *Nichtsporenbildner* vorherrschten. Demgegenüber bestanden die Infektionen in $\frac{1}{2}$ -Würze, die „gestoßen“ wurde (Tab. 1, 15), bei geringer und langsamer Entwicklung wieder ausschließlich aus *Sporenbildnern*.

Von größter Bedeutung erwies sich auch die Art der Sterilisierung des Glasstabes vor dem Stoßen. Eintauchen in Spiritus und dessen Abbrennen wirkte etwas besser als Eintauchen in 70%igen Alkohol; sehr starkes Glühen und schnelles Einführen verminderte die Infektionswahrscheinlichkeit, führte aber fast regelmäßig zum Abplatzen des Glases. Es sei hier darauf hingewiesen, daß SCHANDERL selbst angibt, daß 5maliges Eintauchen von mit Sporen behafteten Gipsperlen in Spiritus und 5maliges Abbrennen des Spiritus nicht genügt, solche Perlen steril zu bekommen. Warum soll der Glasstab nach einmaligem Abbrennen also steril sein? Unterschiede ließen sich auch in der Sorgfalt des Abflammens der Wattepfropfen und des Arbeitens mit der Röhrenöffnung in der Flamme feststellen, wobei jedoch ein hoher Prozentsatz der Röhren durch Springen überhaupt ausgeschieden werden mußte. Kurz gesagt ergab oft bereits ein geringes Außerachtlassen kleiner Vorichtsmaßregeln eine unerwartet höhere Zahl von Infektionen.

Eine ganz wesentliche Erniedrigung der Infektionsfälle konnte erst bei Benutzung eines Metallstabes (Stahl, Aluminium) und sehr starkem und sorgfältigem Erhitzen in der Bunsenflamme erzielt werden. Eine starke Bunsenflamme ergab größere Sicherheit als eine Spiritusflamme, wobei denn auch, wie die Blindserien zeigten, die Manipulation mit 90—100%iger Sicherheit durchgeführt werden konnte.

Jedenfalls waren auch dann noch gewisse Erscheinungen zu berücksichtigen. Bei starker Bewegung der Flüssigkeitssäule (intensive Bespülung der Innenwände bis in die Region des Wattepfropfens und zur Öffnung, was auch im Hauptversuch nur schwer zu vermeiden ist) ergab sich eine nicht unwesentliche Erhöhung der Infektionsrate. Interessanterweise ließ sich eine ähnliche Beobachtung bei einer größeren Anzahl Röhren (insgesamt mehrere Hundert!) mit verschiedenen Nährlösungen machen, die nach dem Autoklavieren und Bebrütung von mehreren Wochen klar geblieben waren (welche Bedingung ja auch für die Röhren vor dem Zerstoßen der Samen im Hauptversuch zutrifft), dann nach starkem Schütteln unter Benetzung der Wände bis hart an den Wattepfropfen nach weiterer Bebrütung immerhin einige Prozent Wachstum zeigten. Dabei wäre grundsätzlich zu fragen, ob das „trockene“ Innere, sowie die Watte überhaupt nach dem Autoklavieren steril angenommen werden kann und hier nicht die Voraussetzungen der (mehr oder weniger) trockenen Sterilisation vorliegen, wobei bekanntlich mindestens $\frac{1}{2}$ Stunde 150—200° nötig sind. In derselben Richtung liegt auch die Beobachtung, daß sich beim „sterilen“ Gießen von Agarplatten in trocken

sterilisierten Petrischalen öfters unter der Agarschicht, vom Glasboden ausgehend, ganze Schwärme von Kolonien weniger Arten sehr resistenter *Sporenbildner* finden, die sich nach Isolierung sehr gut mit aus Erbsenröhrchen gewonnenen vergleichen ließen. (Auf Speziesfragen kann infolge des zur Verfügung stehenden Raumes nicht eingegangen werden.)

Jedenfalls ist damit erhellt, daß die von STÜHRK angewandte Methode des Zerstoßens der Samen nicht als unbedingt aseptisch angesehen werden kann. Sein Fehlschluß beruht offenbar auf dem Glauben an die unbedingte Asepsis der Arbeit in einer Impfkammer. Die Methode wirkt elektiv in Richtung bestimmter sehr resistenter *Sporenbildner*. Dazu kommt, wie Blindproben zeigten, eine gleiche Wirkung verschiedener Nährmedien, die demnach auch auf Grund der Verschiedenheit der einzelnen pflanzlichen Substrate für die Hauptversuche angenommen werden kann.

II. Fehlerquellen bei der Sterilisation der Samen vor dem Zerstoßen.

Eine sehr wichtige Frage ist auch, welche Sicherheit dafür besteht, daß in den mit Samen und Pflanzenteilen beschickten Röhrchen bereits vor dem Zerstoßen alle Bakteriensporen abgetötet sind.

In den vorher bereits erwähnten Wiederholungen der STÜHRKschen Versuche mit Sterilisation im Dampftopf wurden in 4 Serien mit je 50 Röhrchen z. T. erst nach Abimpfung in Fleischwasserbouillon nur 7, 11, 6 und 18 Röhrchen steril gefunden. Das war auch besonders deutlich, wenn man die *Erbsen* nicht in Wasser, sondern in Erbsenauszugwasser mit Traubenzucker und Pepton ansetzte. Dann war schon makroskopisch in noch mehr Röhrchen Wachstum sichtbar.

Sehr bezeichnend ist, daß nachdem die Fehlerquellen der Manipulation bekannt waren, trotzdem beim Zerstoßen der Samen usw. sowohl mit dem Glasstab als auch mit dem Metallstab bei Beachtung aller nur möglichen Vorsicht in allen Serien mit den verschiedensten pflanzlichen Materialien um 100% der Röhrchen Entwicklung von *Sporenbildnern* zeigten, wenn die Röhrchen vorher im Dampftopf oder 1 mal im Autoklaven 23 Minuten bei 1 atü oder sogar 20 Minuten bei 1,5 atü sterilisiert worden waren. Die Versuche wurden mit frischen *Erbsen*, trockenen *Erbsen*, frischen Samen von *Caragana*, trockenen Samen von *Lupine* und *Ackerbohne*, *Kartoffelwürfeln* in Bohnengröße und *Karottenstücken* durchgeführt. Sogar bei 1 maliger Sterilisation bei 2 bzw. 2,5 atü fanden sich Infektionsraten zwischen 60 und 100%. (Man vergleiche für die Hauptversuche Tabelle II.)

Das Bild änderte sich erst wesentlich, als zu 3—5 mal wiederholter Sterilisation im Autoklaven bei 1,5 atü übergegangen wurde. In der Mehrzahl aller Serien lag dann die Zahl der nach dem Zerstoßen Wachstum zeigenden Röhrchen annähernd an bzw. innerhalb der Fehlerspanne der gleich behandelten Blindserien. (10—15 cem Fleischwasserbouillon mit 0,1% Agar.) Es ergab sich daraus, daß hier also nur noch mit der Fehlerquelle der Manipulation zu rechnen war. Aber selbst nach 3 maligem Autoklavieren ergaben sich im Gegensatz zu 5 maligem in einzelnen Serien durch unkontrollierbare Umstände höhere Infektionsraten.

Tabelle II. Hauptversuche mit Samen und Pflanzengewebe.

Nr.	Behandlung der Röhrrchen	Eisensamen frisch		Eisensamen trocken	Caryopansamen frisch		Lupinen-samen trocken	Ackerbohne trocken	Kartoffel-würfel	Kartoffel-würfel	
		Zahl der Parall.	Wachst. in %	Wiederholungen						pH 6**)	pH 7,2
1	2 Std. Dampftopf, wie Stühnk mit Glasstab	47	93,6	100, 100, 90	100*)	100	90	100	100	100	100
2	1 × 23' 1 atü mit Glasstab zerstoßen	44	100	100	100	—	100	100	100	60	100
3	1 × 20' 1,5 atü mit Glasstab zerstoßen	20	100	100	95	100	—	100	100	35	80
4	3 × 20' 1,5 atü mit Glasstab zerstoßen	20	45	30,55	30—100	45	55	85	70	15	25
5	5 × 20' 1,5 atü mit Glasstab zerstoßen	20	40	25,40	25	40	—	20—100	55	—	—
6	wie 3. mit Metallstab zerstoßen	20	100	100	100	—	85	100	100	30	95
7	1 × 20' 2 atü mit Metallstab zerstoßen	10	20	100	70	—	—	100	100	—	—
8	1 × 20' 2,5 atü mit Metallstab zerstoßen	10	90	100	95	—	—	60	85	—	—
9	wie 4. mit Metallstab zerstoßen	20	5	0	5	—	—	0	0	0	15
10	wie 5. mit Metallstab zerstoßen	10	0	10	0	—	10	10	15	5	0

*) Bei den folgenden Spalten ist die Zahl der ausgewerteten Röhrrchen nicht mehr besonders angegeben, ebenso nur in einigen Fällen Ergebnisse von Wiederholungen. Solche wurden aber von wichtig erscheinenden Serien häufig vorgenommen, besonders mit *Erbesen*, trocken, *Ackerbohne* und *Kartoffeln*, z. T. unter weiterer Variation der Behandlung, z. B. mit nur 3 Erbsen im Röhrrchen. Die Ergebnisse folgten dann ebenfalls den obigen Erscheinungen.

**) Die Röhrrchen mit *pH 6* blieben klar und alle wurden erst nach Abimpfung in je 3 Parallelen mit Fleischwasserbouillon beurteilt.

Alle sich wiederholenden Einzelheiten der Serien können hier nicht aufgeführt werden, sondern es ist nur eine Anzahl typischer Ergebnisse in Tab. II zusammengestellt. Zu Beginn war durchweg in Serien mit je etwa 50 Röhrchen gearbeitet worden. Es ergab sich dann, daß genau so gut bei strenger Einhaltung gleicher technischer Umstände der Manipulation schon mit 20 und sogar 10 Parallelen vergleichbare Ergebnisse erhalten wurden.

Sehr interessant waren die Versuche mit *Karotten*. Zunächst blieben fast 100% der Röhrchen nach dem Zerstoßen klar, ganz gleich welche Manipulation beim Zerstoßen oder welche Form der Sterilisation der Röhrchen benutzt worden war. Die Ursache lag bei der H^+ -Konzentration. Bei pH 6,0 kamen die Sporen nicht zur Entwicklung⁴, wobei auch noch eine verhältnismäßig ungünstige Nährstoffwirkung mitsprechen kann. Andererseits werden die Sporen bei höherer H^+ -Konzentration aber auch leichter abgetötet (siehe hierzu auch unten Tab. III). Bei Einstellung auf pH 7,2 mit $n/10$ NaOH vor dem Sterilisieren folgten die Ergebnisse der Serien dann genau den Infektionsraten bei *Erbsen* usw. und das Wachstum setzte nach dem Zerstoßen dann auch makroskopisch sichtbar ein.

Eine Bestätigung für die vorgenannten Fehlerquellen ist auch, daß beim erneuten „Zerstoßen“ des Inhaltes von Röhrchen, die nach dem ersten Zerstoßen und längerer Bebrütung kein Wachstum zeigten, sich in einer gewissen Zahl die typische Entwicklung von *Sporenbildnern* zeigte. Der Prozentsatz folgte dann ebenfalls gut der Rate in den Blindserien. Ähnlich waren die Ergebnisse, wenn in den Röhrchen mit den bis dahin unberührten *Erbsen* nur gerührt bzw. eine stoßende Bewegung gemacht wurde, doch ließ sich eine geringe Verletzung der *Erbsen* dann nicht ganz vermeiden.

Es ist nicht ganz einfach, eine Erklärung für die äußerst große Resistenz von Sporen in solchen Röhrchen zu finden. Sicher gelten ähnliche Ursachen wie bei der wohlbekannten Schwierigkeit, Bodenproben zu sterilisieren. Man vergleiche z. B. auch Angaben über die erstaunliche Resistenz der Sporen von *Bac. mesentericus*⁵, ebenso über die Resistenz von Sporen in Kreide⁶. Ein Abtötungsversuch mit Sporen von *Bac. mesentericus* sei hier aufgeführt, da er im Zusammenhang mit der vorliegenden Untersuchung interessante Hinweise gibt (Tab. III).

Der Versuch in Tabelle III zeigt, daß das Klarbleiben von Röhrchen nach der Sterilisation kein Beweis für unbedingte Sterilität ist (*Karotten!*). Das Anwachsen der Sporen ist vom pH und außerdem von Faktoren der Nährstoffwirkung abhängig. Vor allem dieser Umstand kann auch eine Erklärung für die starke Entwicklung erst nach dem Zerstoßen geben, indem durch das Zerstoßen ein Freiwerden und stärkere Anreicherung der Flüssigkeit mit not-

⁴ Es sei hier an das Sterilbleiben von Weckgläsern erinnert, das zweifellos nicht durch völlige Abtötung der am Gemüse sitzenden Bakteriensporen bedingt sein kann.

⁵ G. KOSTKA, Praktische Anleitung zur Kultur der Mikroorganismen, Stuttgart 1924.

⁶ R. MEYER, diese Zeitschrift. 13, 250 (1943)

wendigen Stoffen erfolgt. Es sei darauf hingewiesen, daß Bohnenauszugswasser erst nach Zugabe von Traubenzucker und Pepton ein optimales Nährmedium wird (Rezept bei SCHANDERL). Inwieweit eine geringe Verschiebung des p_H -Wertes, die beim Zerstoßen von *Erbsen* beobachtet wurde, von Bedeutung ist, war nicht experimentell zu erfassen. Der Versuch in Tabelle III zeigt weiter, daß die benutzten Sporen von *Bac. mesentericus* sehr gut eine Behandlung von 23 Min. bei 1 atü im Autoklaven überstanden, ausgenommen in saurem Milieu, wobei freie Säure scheinbar schlechter vertragen wurde als gleiches p_H mit Phosphatpuffer. Selbst bei 1,5 atü ist keine unbedingte Abtötung erreicht und es zeigt sich dabei, daß Anwesenheit von Pflanzenmaterial eine die Abtötung verzögernde Wirkung bei *Bac. mesentericus* hat.

Nimmt man dazu noch als gegeben an, daß ähnlich wie MARCUS⁷ das Vorkommen von *Pilzen* in und bis unter die Samenschale zeigen konnte, sich tatsächlich dort auch *Bakterien* befinden können, gegebenenfalls in gewissen Fällen auch interzellulär (vgl. hierzu auch die vorausgehende Arbeit von BURCIK⁸), so läßt sich auch daraus eine erhöhte Unempfindlichkeit gegenüber dem Sterilisationsprozeß erklären (p_H -Schutz, geringe Benetzbarkeit der Samen, mehr oder weniger „wasserfreies“ Milieu u. a.).

Tabelle III. Resistenz der Sporen von *Bac. mesentericus* bei verschiedenen Bedingungen. Je 10 Parallelen, Wachstum in %.

Nr.	Sporenaufschwemmung in:	a 1 × Dampftopf 2 Std.	b 1 × Autokl. 23' 1 atü	c 1 × Autokl. 20' 1,5 atü	d 3 × Autokl. 20' 1,5 atü
1	Pufferlösung p_H 7,3*)	100***)	100	40	0
2	desgl. p_H 5,8	100	80	0	0
3	H ₂ O + Schwefelsäure p_H 5,8	100	30	0	0
4	H ₂ O + Erbsen, p_H 6,8—7,0**)	100	100	100	0
5	wie vorher aber mit Karotten p_H 6,0**)	100	60	0	0

*) Phosphatpuffer.

**) *Erbsen* bzw. *Karotten* vorher im Autoklaven 5 × bei 1,5 atü sterilisiert, dann 2 cem Sporenaufschwemmung zugesetzt.

***) Auswertung immer nach Abimpfung in Fleischwasserbouillon. Bei 4. war aber das Wachstum auch direkt sichtbar.

Damit ist gezeigt, daß neben den Fehlerquellen der Manipulation die von STÜHRK angewandte Form der Sterilisation der Samen keine Gewähr dafür gibt, daß sich nicht vor dem Zerstoßen bereits noch voll-

⁷ O. MARCUS, diese Zeitschrift 13, 1 (1942)).

⁸ E. BURCIK, diese Zeitschrift, vorausgehende Arbeit! Bd. 14, Seite 309, 1949.

kommen entwicklungsfähige Sporen in den Röhrchen befanden. Es besteht demnach zumindest unter Zugrundelegung der STÜHRKSchen Ergebnisse keine Notwendigkeit, die Herkunft der nach dem Zerstoßen von Samen (und in vorliegendem Fall auch Pflanzengewebe) beobachteten *Bakterien* anders anzunehmen als bedingt durch Sporen, die die Sterilisation voll entwicklungsfähig überstehen und solcher, die durch die elektiv wirkende Manipulation eingebracht werden. Um im voraus dem Einwand entgegenzutreten, daß durch die mehrfache Sterilisation im Autoklaven die „Plasmasymbionten“ abgetötet seien, ist es notwendig festzustellen, daß eine solche Herkunft der sporenbildenden Bakterien auf Grund der STÜHRKSchen Versuchsanordnung überhaupt außerhalb jeder Diskussion bleiben muß, da sich mit dieser Methodik in keinem Falle Angaben über den genauen Mikrostandort der Keime machen lassen. Eine solche Folgerung kann nur das Ergebnis einer bloßen Konstruktion sein.

Zusammenfassung.

Eine Nachprüfung und weitere Ausführung der von SCHANDERL als eine Hauptstütze für seine Symbiontentheorie herangezogenen STÜHRKSchen Versuche ergab, daß keine Notwendigkeit dafür besteht, die Herkunft der beobachteten *sporenbildenden Bakterien* anders anzunehmen als bedingt durch das Vorhandensein von die Sterilisation vollkommen entwicklungsfähig überstehenden sehr resistenten Sporen und solchen, die durch die elektiv wirkende Manipulation des Zerstoßens eingebracht werden.

(Aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen)

Untersuchungen zur Stammfrage bei *Azotobacter chroococcum* Beij.*

Von

WILHELM K. FISCHER.

Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 28. November 1947.)

I. Natürliches Vorkommen und Eigenschaften verschiedener Stämme.

Das Vorkommen und die Physiologie, besonders die Stickstoffaneignung von *Azotobacter* wurden eingehend und häufig untersucht, weniger dagegen die Stammfrage. Es wird jedoch allgemein hervorgehoben, daß dieses Bakterium wie kaum ein anderes eine ausgesprochene Variabilität der Erscheinungen und Leistungen besitzt und zweifellos zahlreiche Varietäten im Boden vorkommen, über deren Vorkommen, Eigenschaften sowie Ursachen ihrer Entstehung wir noch kaum unterrichtet sind. Da weiterhin die bisherigen physiologischen Untersuchungen zumeist nur mit einem oder höchstens einigen Stämmen, bei den einzelnen Untersuchern fast immer verschiedener Herkunft, durchgeführt wurden, so erscheint es möglich, daß bisherige sich widersprechende Ergebnisse allein auf die Nichtbeachtung von Stammunterschieden¹ zurückzuführen sind. Nachdem auch Hinweise für eine experimentelle Beeinflussung der Eigenschaften von *Azotobacter* vorliegen, ist die Klärung der morphologischen und physiologischen Stammunterschiede (RIPPEL 4) dringend notwendig.

Aus zahlreichen Untersuchungen ergibt sich, daß die Abgrenzung der Arten *Azotobacter chroococcum*, *A. agilis*, *A. vinelandii* und *A. Beijerinckii* ihre Berechtigung hat. Sie unterscheiden sich durch ihre verschiedenen natürlichen Fundorte (BEIJERINCK (1), LIPMANN, LÖHNIS und WESTERMANN, YAMAGATO und ITANO), in ihren morphologischen und physiologischen Eigenschaften (BEIJERINCK (1,2), LIPMANN, LÖHNIS und WESTERMANN, STAPP und RUSCHMANN, THOMPSON, MOLER, PRAZMOWSKI u. a.) und serologisch (EBERT und RUBEL). Es soll hier nicht weiter auf die Einzelheiten der Abgrenzung der Arten eingegangen werden. Eine Zusammenstellung findet sich bei WAKSMAN, ebenso bei BERGEY, wobei jedoch der dort vorgenommenen Zusammenziehung der

* Auszug aus der Dissertation der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Göttingen: W. K. FISCHER (1946): „Beiträge zur Kenntnis der Biologie von *Azotobacter chroococcum* Beij.“ Die ausführlichen Zahlenergebnisse sind dort zu finden. Siehe auch RIPPEL-BALDES und FISCHER.

¹ Wie weit hierbei verschiedene Rassen aufgestellt werden könnten, sei hier nicht weiter untersucht.

Arten *A. agilis* und *A. vinelandii* gegenüber Bedenken bestehen (vgl. KLUYVER und VAN REENEN und KLUYVER und v. DEN BOUT). Gleiche Gesichtspunkte für die Berechtigung der Artabgrenzung ergeben sich auch aus den folgenden eigenen Untersuchungen.

Bei der weiten Verbreitung von *Azotobacter chroococcum* Beij. in sehr vielen Kulturböden hat die Frage nach den Eigenschaften und der Varietätenbildung besonderes Interesse. Es finden sich zahlreiche Literaturhinweise, daß 1. unterschiedliche Bodenrassen dieser Art vorkommen, die sich in ihren morphologischen und mehr noch physiologischen Eigenschaften unterscheiden, 2. ökologische Faktoren die Eigenschaften von Stämmen bedingen können, daß spontane Stammumwandlung beobachtet wurde und experimentelle Bedingungen die Stämme in ihren Eigenschaften ändern können.

So fanden STAPP und RUSCHMANN die Unterschiede zwischen *A. chroococcum*-Stämmen nur gradueller Natur in verschiedener Kolonie-, Schleim-, Farbstoffbildung, Reservestoffablagerung und ähnlichem.

Bezüglich der Stickstoffbindung wurde sehr häufig auf die unterschiedliche Leistungsfähigkeit verschiedener Stämme hingewiesen und es entstand geradezu der Begriff des „guten“ oder „schlechten Stickstoffbinders“². KRZEMIENIEWSKI fand, daß *A. chroococcum* je nach seiner Herkunft und Ernährungsweise physiologische Rassen bildet, die eine verschiedene Fähigkeit zur Stickstoffbindung besitzen. Er fand die ungleich den Stickstoff fixierenden Rassen konstant. Auch PRAZMOWSKI fand ähnliches. Bei Prüfung von Energiequellen fand GANEY (2) das Stickstoffbindungsvermögen der einzelnen Stämme außerordentlich unterschiedlich, und der Stickstoffgewinn war in weiten Grenzen schwankend. Bei SCHROEDER zeigte ein seit mehreren Jahren auf künstlichem Nährboden weitergezüchteter Stamm kein Stickstoffbindungsvermögen mehr, ein frisch gezüchteter ebenfalls kaum Stickstoffbindung. Nach BORTELS (2) sind die Unterschiede in der absoluten Höhe der Stickstoffbindung bei den verschiedenen Stämmen viel größer als die Schwankungen im Verhältnis der Vanadium- zur Molybdänwirkung. WINOGRADSKY (3) fand nicht eine wirkliche Vergleichseinheit für ein quantitatives Verhältnis zwischen den verbrauchten Substanzen und der Stickstofffixation, weil die Ergebnisse stark von den veränderlichen Experimentalbedingungen und dem Charakter der benutzten Stämme abhingen. KLUYVER und VAN REENEN bemerken bei Untersuchungen über *Azotobacter agilis*, daß „die vielen in unserem Laboratorium allmählich aufgefundenen Varietäten von *A. chroococcum* unberücksichtigt blieben.“ Nach SCHELOUMOVA steigt die Einwirkung von *Azotobacter* auf den Ertrag der landwirtschaftlichen Nutzpflanzen bei Anwendung im Azotogen (Präparat aus zerkleinerter Torfmasse und reiner *Azotobacter*kultur) mit seiner stickstofffixierenden Fähigkeit.

Gutes Wachstum auf Kartoffel wurde nur für einige Stämme gefunden (LÖHNIS und HANZAWA), ebenso verschiedenes Verhalten gegenüber unterschiedlichen Salzkonzentrationen (STAPP und RUSCHMANN, KEUTNER und KEDING, KORINEK).

² Solche Feststellungen älterer Arbeiten, in denen durch unteroptimale Kulturbedingungen z. T. nur recht geringe Gesamt-Stickstoffgewinne erzielt wurden, können jedoch in dieser Hinsicht kaum mehr als beweisend angesehen werden.

Verschiedenes Verhalten gegenüber dem pH -Wert wurde öfters festgestellt. So sind nach STAPP und RUSCHMANN Stämme verschiedener Herkunft verschieden disponiert, was nach diesen Autoren für das Vorhandensein verschiedener an bestimmte Reaktionen angepaßter bodenständiger Rassen spräche. In gleicher Richtung liegen auch Beobachtungen von WENZL (1), ferner von JANKE und Mitarbeitern (1, 2), FEHER, J. K. WILSON und B. D. WILSON, die auch in extrem sauren Böden *Azotobacter* fanden, wo dieses Bakterium sonst nicht vorkommt, endlich von ALTON, der in malaiischen Quarzithöden *Azotobacter* mit einer mehrere Wochen betragenden Inkubationszeit feststellte, welcher sehr säuretolerant ist, bis pH 3,6 wächst, durch $CaCO_3$ gehemmt wird, schlecht Mannit, am besten Stärke verarbeitet.

Auch das Temperaturoptimum scheint bei verschiedenen Stämmen unterschiedlich zu sein, indem nach GREENE *Azotobacter*-Stämme aus Arizona-Böden im Vergleich zu solchen aus gemäßigten Breiten besonders bei höherer Temperatur mehr Stickstoff assimilieren. DHAR gibt das Temperaturoptimum für *Azotobacter*-Stämme aus den Tropen zu $35^{\circ}C$, gegenüber 28° für solche aus gemäßigten Breiten an.

Offenbar haben verschiedene Stämme auch ein unterschiedliches Wahlvermögen gegenüber Kohlenstoffquellen. Zweifellos sind Widersprüche in den Angaben z. T. durch unterschiedliche Bedingungen der Kultur und der Zusammensetzung des Nährsubstrates bedingt, andererseits sicher aber auch durch die Benutzung verschiedener Stämme. WINOGRADSKY (5) teilt auf Grund der Bevorzugung bestimmter Kohlenstoffquellen, bei Prüfung 7 verschiedener, darunter Äthylalkohol und Natriumbenzoat, auf dessen Verwertbarkeit dieser Autor zuerst hinwies, *Azotobacter* in 4 Gruppen ein (6, 4). Bei Prüfung von 4 Stämmen gegenüber Benzoat durch GUITTONNEAU und CHEVALIER (2) verarbeiteten nur 2 das Benzoat, was, wie später gezeigt wird, womöglich auch auf die Konzentrationsverhältnisse zurückzuführen ist. Noch bezeichnender für das feine Wahlvermögen verschiedener Stämme ist das unterschiedliche Verhalten gegenüber Para-, Ortho- und Metaoxybenzoat. Auch über das Vorkommen von Stämmen im Boden, die keinen Mannit, aber Rohrzucker, Dextrin und Stärke verarbeiten (SMITH), und über die Abhängigkeit der Häufigkeit des Vorkommens von Stämmen, die salicylsaures Natrium als Kohlenstoffquelle verarbeiten, von der Bodenfruchtbarkeit, wurde berichtet (GUITTONNEAU und CHEVALIER 1). R. NILSSON zeigte, daß auf Glykose gezüchteter *Azotobacter* kein auf Mannit eingestelltes Enzymsystem besitzt, dieses bei Züchtung darauf sich aber bald einstellt.

Auch im Verhalten einzelner Stämme gegenüber gebundenem Stickstoff zeigen sich deutliche Unterschiede, wie z. B. GAINNEY (3) bei Prüfung von 65 Reinkulturen gegenüber Nitratsstickstoff unterschiedliche Empfindlichkeit fand. GAINNEY spricht von toxischer Wirkung des NO_3 -Ions auf Reinkulturen. Harnstoff wirkte nicht giftig. DEN DOREN DE JONG fand bei 5% KNO_3 Hemmung des Wachstums aller Stämme, 3% ließ bei wenigen Stämmen Wachstum zu, 2%, 1% und 0,5% ließen einen Teil der Stämme gut wachsen, hemmten aber andere. Höhere Konzentrationen von α -Alanin wurden weniger gut vertragen. Einige Stämme vertrugen nicht mehr als 0,2%, bei anderen lag die Grenze dagegen bei 0,5%.

Mehrfach wurde eine spontane Änderung in der Farbstoffbildung beobachtet. (Siehe u. a. PRAZMOWSKI, BEJERINCK, LÖHNIS und WESTERMANN, OMELIANSKI und SEWEROWA, RIPPEL und LUDWIG und RIPPEL 1).

Durch Einwirkung von hohen Gaben von gebundenem Stickstoff konnte BEN DOOREN DE JONG deutliche Veränderungen der Form erzielen, die jedoch sofort bei Überimpfung auf normale Nährmedien verschwanden. Die Stickstoffbindungsfähigkeit hatte dabei nicht gelitten. Bei Züchtung in flüssigen Nährmedien mit hohen Gaben an gebundenem Stickstoff tierischer Herkunft (Pepton und Fleischwasser) konnte er auch bleibende Änderungen der Form feststellen, einmal sogar auch Verlust der Stickstoffbindungsfähigkeit, die jedoch durch Ausstrich auf normalen Medien wieder regeneriert werden konnte, indem einzelne Kolonien die Fähigkeit wiedergewannen, den Luftstickstoff zu binden. RUBENTSCHIK und ROJSIN isolierten zwei Stämme, die durch eine Reihe von Passagen auf Medien mit steigenden Mengen an Stickstoff (Pepton, Kaliumnitrat, Ammoniumsulfat) an die Entwicklung in Gegenwart von hohen Stickstoffkonzentrationen gewöhnt werden konnten. Diese Stämme verloren dann im weiteren die Fähigkeit, den freien Stickstoff zu fixieren. (Siehe hierzu auch Abschnitt II, 2).

MISCHUSTIN und BACHARJEWÄ sehen die Bödenazidität als den bestimmenden Faktor für das Erscheinen von inaktivem *Azotobacter* im Boden an. Eine aktive *Azotobacter*rasse, in angesäuerte bzw. natürlich saure Böden gebracht (pH 4,0—5,0), verliert nach diesen Autoren schon nach kurzer Zeit die Fähigkeit, auf gewöhnlichen Gelnährböden zu wachsen. Solche Stämme hatten dann stark verminderte Fähigkeit, den gasförmigen Stickstoff zu fixieren. Sie bildeten jedoch Kolonien auf Bodenplättchen und auf Nährböden mit Stickstoffverbindungen, und bei längerer Kultur auf normalen mannithaltigen Nährböden wird die stickstofffixierende Fähigkeit wieder hergestellt. Diese Angaben sind auch von besonderer Bedeutung im Zusammenhang mit Angaben über das Vorkommen von *Azotobacter*-ähnlichen Mikroorganismen, die auf stickstofffreien mannithaltigen Nährböden keine Entwicklung zeigen, jedoch auf Fleischwasser- und Peptonagar mit Mannit oder Glykose wachsen (DIANOWA und WOROSCHLOWA).

Durch Bestrahlung von Einzell-Kulturen mit Radiumemanation erhielten STERN und SUSHKINA neue Rassen, die sich kulturell, morphologisch und physiologisch von der Ausgangsrasse unterschieden und erhöhte Fähigkeit zur Stickstofffixation zeigten, die sie auch bei Einbringen in Torf (Azotogen) behielten und die bis dahin $3\frac{1}{2}$ Monate konstant geblieben war.

1. Gewinnung und Vorkommen von *Azotobacter*-Stämmen.

Es wurden im Laufe eines Jahres (1943/44) von 60 verschiedenen Entnahmestellen 81 Bodenproben untersucht und zwar von 37 Orten mit 55 Proben in Südhannover in der Umgebung von Göttingen und von 23 Orten mit 26 Proben im Gebiet um Weilburg (Oberlahnkreis). Das Versuchsfeld des Institutes für Mikrobiologie in Göttingen fand besonders häufige und eingehende Berücksichtigung.

Aus den Bodenproben wurden mit Hilfe einer nach CURIE (vergl. weiter dazu die Arbeiten von WINOGRADSKY 2, 3, 4 und die zahlreichen modifizierten Bodenplatten-Methoden, Literatur bei RIPPEL 4) modifizierten Bodenstaub-Agarplatten-Methode durch Aufstreuen von Bodenpartikelchen durch ein Fliegendrahnetz und die folgenden üblichen Manipulationen der Reinzüchtung schließlich Reinkulturen gewonnen und für weitere Untersuchungen benutzt.

Dabei wurde besonders nach Stämmen mit unterschiedlichen Eigenschaften gesucht. Die Auswahl der Entnahmestellen (Böden von ver-

schiedener geologischer Grundformation, Natur- und Kulturböden, verschiedener pH u. a.) und die Methodik der Elektivkultur erfolgte unter dem Gesichtspunkt, gegebenenfalls Zusammenhänge zwischen den Stammeigenschaften und der Herkunft oder auch der Art der Gewinnung aufzufinden.

Folgender Nährboden fand Verwendung: (RIPPEL 2) K_2HPO_4 0,1 %, $CaCO_3$ 0,1 %, $MgSO_4$ 0,05 %, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 10 mg/%, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0,5 mg/%, Mannit 2 %, Agar 1,2 %. In der Folge immer kurz als Normalagar bezeichnet, ohne Agar als Normallösung, entsprechend mit Glykose anstelle von Mannit als Normal-Glykose-Agar.

Die Bodestaub-Agarplattenmethode zeigte im Vergleich zur Nachweis-kultur in Beijerinckscher Elektivlösung mit Zusatz von 0,025 % Na_2MoO_4 (vergl. DEN DOOREN DE JONG, weiter BORTELS 1 ebenso VAN NIEL) 31,57 % mehr Bodenproben *Azotobacter* — positiv an, wobei es sich gerade um Böden mit zweifelhaftem und nur schwachem Vorkommen handelte.

Von den 60 (81)³ Entnahmestellen waren nur 18 (25) positiv, da bewußt Örtlichkeiten berücksichtigt wurden, an denen normalerweise *Azotobacter* nicht häufig ist, aber vielleicht Stämme mit besonderen Eigenschaften bzw. Anpassungen erwartet werden konnten. Von 10 Garten- und Ackerböden waren alle 10 *Azotobacter*-positiv, von 47 unbearbeiteten Naturböden (Wald, Wiese, Feldwege) waren nur 6 positiv, die aber stets neben Orten mit starkem *Azotobacter*-Vorkommen lagen. Zwei ungewöhnlichere Fundorte waren eine rings von gepflasterter Straße umgebene Baumscheibe und Bachschlamm.

Das pH aller positiven Kulturböden lag zwischen 6,4 und 5,6 im Wasserauszug und 6,2 und 4,6 im KCl-Auszug, das der negativen Naturböden zwischen 3,9 und 5,7 im Wasserauszug und 3,7 und 5,2 im KCl-Auszug. Das Vorkommen von *Azotobacter* ist demnach bei Gegenüberstellung von Kultur- und Naturböden im Wasserauszug scharf begrenzt (5,7 : 5,6), während sich die pH -Grenzen im KCl-Auszug überschneiden (4,6 : 5,2). Das scheint dafür zu sprechen, daß für das Vorkommen von *Azotobacter* in erster Linie die aktuelle Azidität der begrenzende Faktor ist. Ein deutlicher Einfluß des pH zeigte sich bei drei untersuchten Kompostproben. Während zwei mit pH 6,4 und 5,8 (KCl 6,0 und 5,1) positiv waren, zeigte sich die andere mit pH 5,0 (KCl 3,9) negativ. Aus solchen Ergebnissen lassen sich keine neuen Gesichtspunkte für das Vorkommen von *Azotobacter* ableiten (vgl. NIEMEYER, GAINNEY 1, WENZL 1, 2, 3, KRAUSE, jedoch JANKE und Mitarbeiter, FÉHÉR, WILSON und WILSON).

Es wurden schließlich 57 Reinkulturen der aus den verschiedenen Bodenproben gewonnenen Stämme benutzt, darunter ein *A. vinelandii* und ein *A. Beijerinckii*. Dazu kamen 13 Stämme von *A. chroococcum* aus osteuropäischen Böden bis zur Ukraine, die von anderer Seite zur Verfügung gestellt worden waren.

Das Ziel dieser Arbeit, Aufklärung über Stammunterschiede zu bekommen, konnte zweifellos nur mit unbedingten Reinkulturen erreicht werden, da Be-

³ Die Zahl in Klammern bedeutet die Zahl der Bodenproben.

obachtungen zeigten, daß durch Verunreinigungen nicht nur die Koloniebildung und Morphologie der Zellen, sondern auch physiologische Eigenschaften vorgetäuscht werden, die in Reinkulturen nicht vorhanden sind. Die Stämme wurden deshalb regelmäßig mit den üblichen Methoden der Reinheitsprüfung (mikroskopisch, Impfen in Peptonbouillon und auf Bouillonagar) mit äußerster Sorgfalt auf Reinheit geprüft.

Außerdem wurde gefunden, daß sich Normallösung mit 0,5–2,0% Natriumoxalat anstelle von Mannit dazu eignet, in scheinbaren Reinkulturen bestimmte Spezies (wahrscheinlich *Proaktinomyceten* oder *Mycobakterien*) nach 10-wöchiger und längerer Kulturdauer nachzuweisen, die anders nur sehr schwer zu erfassen sind. *Azotobacter* stirbt in Oxalsäure ab, während die vorgenannten Keime dagegen resistent sind. Die gleichen Spezies lassen sich auf demselben Wege auch aus Boden anreichern. Dabei muß vorerst noch offengelassen werden, ob Oxalsäure von vorgenannten Keimen nicht sogar verarbeitet wird; es liegen gewisse Hinweise dafür vor.

2. Makro- und mikroskopische Merkmale der Stämme.

Es ist eine wohlbekannte Erscheinung, daß selbst aus Einzellkulturen hervorgegangene Stämme von *A. chroococcum* eine bedeutende Variationsbreite zeigen und eine einwandfreie Abgrenzung verschiedener Stämme gegeneinander nach Kolonie- und Zellmerkmalen, die als stammar charakteristisch zu gelten haben, sehr schwierig ist.

Die folgende Beurteilung wurde auf Grund einer bis zu zweijährigen Beobachtung und in regelmäßigen Abständen und Wiederholungen nach ganz bestimmtem Schema vorgenommenen Protokollierungen der jeweils auch unter veränderten Kulturbedingungen gefundenen Merkmale gewonnen, um eine rein subjektive Beurteilung nur eines Kulturansatzes auszuschalten. So konnten auf variationsstatistischem Wege für die einzelnen Stämme bestimmte kennzeichnende Eigenschaften festgelegt werden. Das trifft vor allem auch für die in Tabelle I in v. H. aller protokollierten Kontrollen angegebenen Häufigkeitsgrade des dunklen bzw. hellen Farbtypus zu.

Es sei hier nur zusammenfassend kurz gesagt, daß sich einige Stämme rein subjektiv schon deutlich abgrenzen ließen, vor allem die beiden anderen *Azotobacter*-Arten, *A. vinelandii* und *A. Beijerinckii*, die in allen Fällen selbst von den am weitesten variierenden *A. chroococcum*-Stämmen deutlich verschieden gefunden wurden. Doch traten auch verschiedene *A. chroococcum*-Stämme mit auffallenderen Merkmalen hervor, u. a. Stamm G und Stamm IB, die in den folgenden Untersuchungen darum auch besondere Beachtung finden (vgl. Abb. 1–4).

Kolonieunterschiede waren meist nur durch die unterschiedliche Schnelligkeit des Wachstums der einzelnen Stämme bedingt. Die Form war entweder mehr flach und schnell trocken werdend oder gewölbt und später zerfließend, was auch in Zusammenhang mit der verschiedenen Schleimbildung der Stämme stand. Unterschiede in der Zellgröße der einzelnen Stämme waren vorhanden, jedoch nicht sehr auffällig und wurden erst durch gleichzeitige Zusammenhänge mit der Zellform und dem strukturell-mikroskopischen Aussehen deutlicher. Zwei deutliche Typen herrschten vor: Stämme mit einer Tendenz zu rundlichen bis ovalen, meist etwas größeren Zellen, und solche mit

kleineren schlanken und mehr stäbchenförmigen Zellformen. Dazwischen lagen gewisse Übergänge und mehr oder weniger zu charakterisierende weitere Typen. Beweglich waren, im Gegensatz zu dem erstgenannten Typus, fast ausschließlich Stämme vom schlanken Zelltypus und zwar mit großer Aktivität und hohem Prozentsatz der Zellen.

Die Fähigkeit zur Bildung des bekannten dunklen Farbstoffes war bei den einzelnen Stämmen sehr verschieden, wobei sowohl der Farbton, als auch die Farbtiefe getrennt berücksichtigt werden müssen (zusammen in der Folge kurz als Farbtypus bezeichnet). Die Farbtiefe wechselte bei Änderung der Kulturfaktoren zuerst, viel weniger und erst in zweiter Linie der Farbton und damit auch der Farbtypus, der für die einzelnen Stämme sehr charakteristisch ist (z. B. braun-marmoriert, rot- bis braunocker, rußig-schwarz).

3. Die Stickstoffbindungsfähigkeit der Stämme.

Für die Prüfung der Stickstoffbindungsfähigkeit aller 70 Stämme mußte eine optimale Anordnung gefunden werden. Sie war im wesentlichen durch die bereits von RIPPEL (2) benutzte Normallösung mit 0,1% Agar gegeben, worin innerhalb 2—3 Tagen ein Wachstum ermöglicht wird, das fast die Grenze des maximal erreichbaren darstellt und damit einen Vergleich mit günstigen natürlichen Verhältnissen am ehesten zuläßt.

50 ccm Normallösung mit 0,1% Agar in 250er Erlenmeyerkolben aus Jenaer 20er Glas $\frac{1}{4}$ Stunde im Autoklav bei 120° C sterilisiert. Während des Abkühlens wurde bei etwa 45° C mehrfach umgeschüttelt, um eine bessere Verteilung des gelierenden Agars zu erreichen (RIPPEL 2, 3). Geimpft wurde 1 Stunde nach dem Sterilisieren von Normalagarkultur soviel Bakterienmaterial, wie an der Spitze einer Platinnadel haftet. Bebrütung bei 30° C. Stickstoffbestimmung nach KJELDAHL. Vor der Verarbeitung wurden die Kulturen auf Reinheit geprüft. Es wurden immer für jede Prüfung zwei bis mehrere Parallelen angesetzt. Alle N-Zahlen beziehen sich auf Menge der gebotenen C-Quelle, soweit das später nicht anders angegeben ist. Bei längerer Kulturdauer ist jedoch die C-Quelle restlos verbraucht, der Wert also = verarbeiteter C-Quelle.

In zahlreich wiederholten Prüfungen ergab sich nun überraschend, daß sich die Stämme keineswegs grundsätzlich und bedeutend in ihrer maximalen Stickstoffbindungsfähigkeit je 1 g Mannit unterscheiden, sondern die Stickstoffgewinne nach 7 Tagen Wachstum liegen durchweg auf gleicher Höhe innerhalb einer Spanne zwischen 16,5 bis 19,5 mg Stickstoff je 1 g Mannit, was einer maximalen Schwankung von $\pm 1,5$ mg um einen Mittelwert von 18 mg entspricht und vorher bereits in ausgedehnten Vorversuchen als durch die Außenfaktoren bedingte normal zu erwartende Abweichung innerhalb von Parallelen gefunden worden war. Der Mittelwert von 68 Stämmen⁴ ist 17,76 mgN/g Mannit.

⁴ Zwei der 70 untersuchten Stämme können hier infolge ihrer Vorkultur auf stickstoffhaltigem Nährboden nicht ohne weiteres berücksichtigt werden, wie sich später ergab. Vgl. Abschnitt II, 2.

Allein ein Stamm (4—S) fällt mit einem maximalen Wert von 13 mg N etwas aus der Reihe, und auch in weiteren Prüfungen konnte keine höhere Stickstoffbindung für diesen Stamm gefunden werden. Er nimmt auch in seinen morphologischen Eigenschaften und in seinem Verhalten gegenüber verschiedenen Kohlenstoffquellen (siehe nachher) eine gewisse Sonderstellung ein.

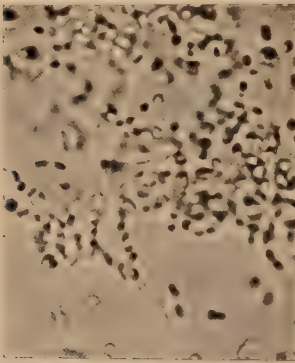


Abb. 1. *A. chroococcum*, Stamm G, mit hoher Anfangsintensität.

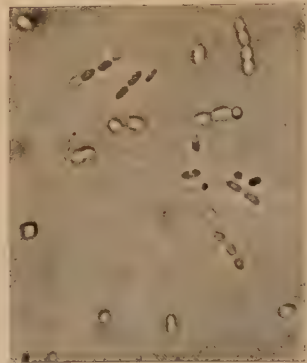


Abb. 2. *A. chroococcum*, Stamm IB, mit geringer Anfangsintensität.

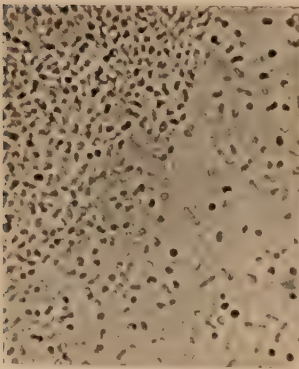


Abb. 3. *A. vinelandii*, Stamm KG, mit hoher Anfangsintensität.



Abb. 4. *A. Beijerinckii*, Stamm K, mit geringer Anfangsintensität.

Alle 4 Stämme nach 2 Tagen Wachstum bei vollkommen übereinstimmenden Kulturbedingungen und gleicher Präparation aufgenommen. Vergr. 640 fach.

Von besonderem Interesse sind nun die Ergebnisse der Stickstoffbindung der Stämme nach 2 Tagen Wachstum. Es ergab sich, daß sich die Stämme sehr deutlich in der Anfangsintensität ihres Wachstums und damit der Stickstoffbindung unterscheiden (in der Folge immer nur kurz Anfangsintensität genannt). Die Stickstoff-

bindung der Stämme nach 2 Tagen bewegt sich bei vorgenannter Testanordnung zwischen Werten von 0,34 mg N (*Stamm 2 T*) und 14,15 mg N (*Stamm G*). Manche Stämme haben also nach 2 Tagen praktisch noch keinen Stickstoff gebunden, während andere sich bereits dem maximal erreichbaren Wert nähern. Das ausgedehnte Zahlenmaterial kann hier nicht ausführlich gebracht werden. Beispiele für einige Stämme finden sich in Tabelle II. Aus den Abbildungen 1—4 ist objektiv die verschiedene Anfangsintensität ersichtlich.

Die Eigenschaften der Stämme blieben während eines Zeitraumes von über zwei Jahren in zahlreichen Prüfungen völlig konstant⁵.

4. Die Variationskurve der Eigenschaft der Anfangsintensität der Stickstoffbindung.

Um zu sehen, wie sich die vorgenannten 68 Stämme hinsichtlich ihrer Anfangsintensität zahlenmäßig verteilen, wurden sie in 8 Gruppen von je 2 mg-N-Spanne eingeordnet (Abb. 5; siehe auch Tab. I für 66 Stämme). Aus Abb. 5 ergibt sich die überraschende Tatsache, daß die Kurve nicht eingipflig ist, wie man sie als normale Variationskurve hätte erwarten können, sondern ausgesprochen zweigipflig.

Das ist nicht nur bei Berücksichtigung aller Stämme der Fall (Kurve I), sondern auch, wenn alle Stämme ausgeschieden werden, die auf Grund gleicher Herkunft und gleicher Eigenschaften als identisch anzusehen sind (Kurve II). Kurve II ergibt sich aus der Bewertung von 45 verbleibenden Stämmen. Sehr interessant ist nun, daß auch Kurve III der 13 Stämme osteuropäischer Herkunft ebenfalls zweigipflig ist, die Spitzen der Maxima durch die geringere Zahl der bewerteten Stämme jedoch flacher sind. Eine ähnliche Kurve ergab bereits eine Prüfung von 17 zuerst isolierten Stämmen.

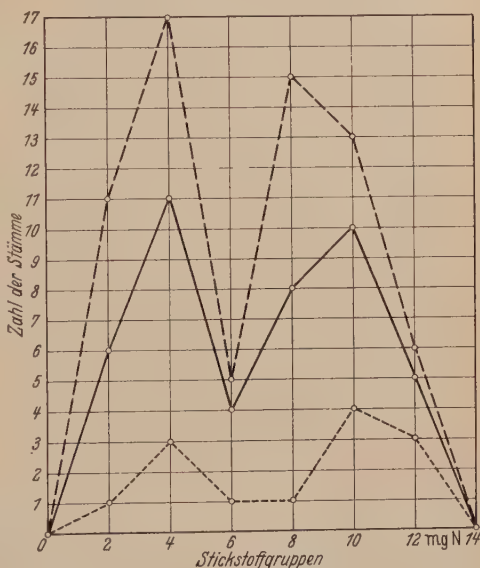


Abb. 5. Variationskurve der Eigenschaft der Anfangsintensität der Stickstoffbindung bei 68 Stämmen von *Azotobacter*.

Auf der Abszisse ist die Höhe der nach 2-tägiger Kulturdauer erfolgten N-Bindung in mg N abgetragen, wobei zu Gruppen von 0—2, 2—4 usw. mg N zusammengefaßt ist. Auf der Ordinate ist die dazu gehörige Anzahl der Fälle abgetragen. — — — — Kurve aller Stämme. ————— Kurve nach Ausscheidung einer Anzahl (23) aus gleichen Bodenproben isolierten und auf Grund ihrer Merkmale sicherlich identischen Stämme. Kurve von 13 aus Osteuropa herkommenden Stämmen.

⁵ Nach über dreijähriger künstlicher Kultur wurden einige charakteristische Stämme erneut geprüft und unverändert gefunden.

Die natürlich im Boden verbreiteten Stämme von *A. chroococcum* kommen also allgemein in dieser Verteilung vor, und die deutlich zweipfligige Variationskurve spricht für das Vorkommen von zwei natürlichen Formenkreisen.

5. Beziehungen zwischen der Anfangsintensität und anderen Stammerkmalen.

Beim Vergleich der Anfangsintensität und den Merkmalen der beiden oben erwähnten morphologischen Gruppen (1. Typus: mehr runde, abgestumpfte, größere Zellen, Bewegungsfähigkeit gering oder fehlend; 2. Typus: mehr stäbchenförmige, schlanke Zellen mit stärkerer bis starker Beweglichkeit) ergab sich, daß der erstgenannte Typus ausschließlich zu den Stämmen mit geringer Anfangsintensität gehört, während die stark beweglichen Stämme nur in den hohen Stickstoff-

Tabelle I. Häufigkeit der Zuordnung der Stämme zum Farbtypus dunkel oder hell in v. H. der Ergebnisse der protokollierten Kontrollen und zahlenmäßige und prozentuale Verteilung der Stämme auf die N-Gruppen der verschiedenen Anfangsintensität*.

Dunkel										Hell								
1	2	3	4	5	6	7	8	9		2	3	4	5	6	7	8	9	
0-2	IA	33	31	94						BG	33	24	73					
	IB	33	33	100						BG—L	33	24	73					
	E—a	29	29	100														
	E	30	29	97														
	4—S	24	24	100	9	82	5	83						2	18	1	17	
	T	33	20	61														
	T—L	33	20	61														
	2T	31	21	68														
	2T—a	31	22	71														
2-4	5—S	24	23	96						J ₄	41	41	100					
	6—S	24	24	100						J ₅	41	35	85					
	12—S	24	20	83						IVB	33	33	100					
	V	30	29	97						KO	33	28	85					
	G W—a	29	26	90	9	56	7	70		KO—L	33	28	85	7	44	3	30	
	2 W	31	26	84						2KO	31	28	90					
	2 W—a	31	26	84						2KO—a	31	24	77					
	2BG	31	27	87														
	2BG—a	31	28	90														

*) Erklärung der in den einzelnen Spalten verzeichneten Werte:

Spalte 1 = Stickstoffgruppen, je 2 mg N-Spanne wie in Abb. 5.

Spalte 2 = Bezeichnung der Stämme.

Spalte 3 = Zahl der protokollierten Kontrollen.

Spalte 4 = darunter dunkel bzw. hell.

Spalte 5 = wie Spalte 4 i. v. H.

Spalte 6 = Zahl der in die einzelnen N-Gruppen entfallenden Stämme.

Spalte 7 = Spalte 6 i. v. H. der gesamten Stämme, (hell und dunkel) der N-Gruppe.

Spalte 8 und 9 = wie in Spalte 6 und 7, doch alle übereinstimmenden Stämme ausgeschlossen.

Tabelle I. (Fortsetzung.)

	Dunkel									Hell								
1	2	3	4	5	6	7	8	9	2	3	4	5	6	7	8	9		
4-6	<i>Ko1</i>	41	28	68					<i>W</i>	33	18	54						
	<i>G W</i>	30	24	80	2	40	2	50	<i>W-L</i>	33	18	54	3	60	2	50		
									<i>2-S</i>	24	20	83						
6-8	<i>2 WT-a</i>	31	23	74					<i>II₇</i>	41	41	100						
	<i>V-a</i>	30	26	87					<i>H₅</i>	36	36	100						
	<i>9-S</i>	24	18	75	3	20	3	38	<i>KP₂</i>	41	40	98	12	80	5	62		
									<i>K P₇</i>	41	41	100						
									<i>Ku₂₁</i>	41	35	85						
									<i>KH₄</i>	33	29	88						
									<i>7</i>	30	30	100						
									<i>7 Gl</i>	30	30	100						
									<i>6</i>	30	30	100						
									<i>9</i>	30	30	100						
									<i>0,04</i>	30	30	100						
									<i>0,1</i>	30	30	100						
8-10	<i>BD</i>	30	30	100					<i>IIa</i>	33	26	79						
	<i>BD-a</i>	30	30	100					<i>Kol I</i>	41	28	68						
	<i>1-S</i>	24	23	96	6	46	5	50	<i>Kol</i>	28	20	71	7	54	5	50		
	<i>13-S</i>	24	24	100					<i>Ku₂₀</i>	41	28	68						
	<i>7-S</i>	24	24	100					<i>KF</i>	33	29	88						
	<i>11-S</i>	24	24	100					<i>WT</i>	33	29	88						
10-12									<i>2 WT</i>	31	26	84						
	<i>SO</i>	30	30	100	4	80	3	75	<i>3-S</i>	24	20	83	1	20	1	25		
	<i>SO-a</i>	30	30	100														
	<i>8-S</i>	24	24	100														
14	<i>10-S</i>	24	24	100														
	<i>G</i>	41	41	100	1	—	1	—	—									

gruppen zu finden sind. Das scheint verständlich, indem starke Beweglichkeit sicher ein Zeichen für energische Stoffwechselvorgänge ist bzw. diese voraussetzt.

Besonders eingehend mußte die Farbstoffbildung berücksichtigt werden, die nicht nur ein artcharakteristisches Merkmal ist, sondern auch, wie schon vorher erörtert wurde, unter Bewertung von Farbtiefe und Farbton als stammcharakteristischer Farbtypus auftreten könnte.

Um diese Beobachtungen in Beziehung zur Anfangsintensität der einzelnen Stämme setzen zu können, wurden diese in Tabelle I unter Aufteilung in Stämme mit dunklem und hellem Farbtypus und gleichzeitiger Berücksichtigung der Zuordnung zu den einzelnen Stickstoffgruppen von je 2 mg N-

Spanne wie in Abbildung 5 zusammengestellt. Aus der Tabelle ist auch gleichzeitig ersichtlich, wie die Bewertung auf Grund von zahlreichen Protokollierungen gewonnen wurde und wie sich die Stämme, deren Bezeichnung aus der 2. Spalte ersichtlich ist, auf die einzelnen Gruppen verteilen.

Schon bei der Beurteilung der Farbstoffbildung der Stämme in einem Ansatz zeigten sich deutliche Zusammenhänge zwischen dem Farbtypus und der Anfangsintensität, indem auffallenderweise Stämme von ausgesprochen dunkler Färbung sowohl in den Gruppen mit niedriger als auch in Gruppen mit hoher Anfangsintensität zu finden sind. Doch waren innerhalb eines Ansatzes auch immer zahlreiche Ausnahmen vorhanden, und erst durch die variationsstatistische Auswertung der zahlreichen protokollierten Kontrollen zeigten sich die Zusammenhänge deutlich (Tab. I).

Danach waren von 66 Stämmen⁶ 34 dem Farbtypus dunkel und 32 dem Farbtypus hell zuzuordnen. Gibt man nun die Zahl der in die einzelnen Stickstoffgruppen entfallenden Stämme in v. H. aller in die betreffenden Stickstoffgruppen entfallenden dunklen und hellen Stämme an (Tab. I, Spalten 6 und 7), so ergibt sich eine Kurve, die für die Stämme mit dunkler Farbstoffbildung zweigipflig ist (Abb. 6). (Die

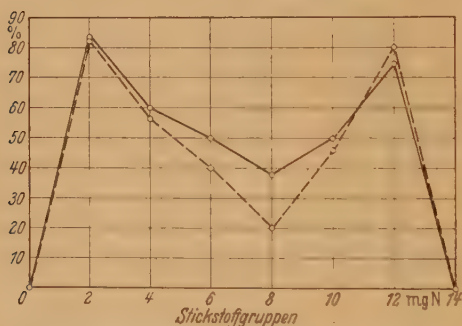


Abb. 6. Häufigkeit der Verteilung der Stämme von *Azotobacter* mit dunkler Pigmentbildung auf die Gruppen verschiedener Anfangsintensität i. v. Hundert aller in die verschiedenen Gruppen entfallenden Stämme.

— — — — — Kurve I, Stämme wie in Kurve I in Abb. 5.
- - - - - Kurve II, Stämme wie in Kurve II in Abb. 5.

nicht besonders gezeichnete Kurve der hellen Stämme muß natürlich eingipflig sein, da sie ja eine direkte Funktion der vorigen ist.) Diese Kurve ist auch zweigipflig, wenn man die in Abb. 5 (ausgezogene Kurve) dargestellten Stämme allein berücksichtigt, ebenso wenn man Stämme nicht berücksichtigt, deren v. H.-Zuordnungswert in Tab. I Spalte 5 kleiner als 68 ist, d. h. Stämme mit einer stark wechselnden Tendenz zum hellen oder dunklen Farb-

typus. Diese Kurve ist hier nicht besonders gezeichnet.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß sich durch variationsstatistische Auswertung zahlreicher Kontrollen zeigen ließ, daß der dunkle Farbtypus sowohl bei Stämmen mit geringer als auch mit hoher Anfangsintensität der Stickstoffbindung gehäuft vorkommt, während der hellere Farbtypus mehr den Mittelgruppen zuzuordnen ist⁷. Die nach der Anfangsintensität sowie nach morphologischen

⁶ Die beiden Stämme von *A. vinelandii* und *A. Beijerinckii* können wegen ihrer artverschiedenen Farbstoffbildung hier nicht berücksichtigt werden.

⁷ Hieraus ergeben sich u. U. interessante Gesichtspunkte für die Farbstoffbildung als stoffwechselphysiologisches Problem in Beziehung zur Stickstoffbindung. Vgl. auch S. 378.

Gesichtspunkten und der Beweglichkeit deutlich hervortretenden Formenkreise lassen sich also hinsichtlich der Farbstoffbildung nicht so scharf gegeneinander abgrenzen, obwohl sich auch hier gruppenweise Beziehungen zur Anfangsintensität aufzeigen lassen.

Ein Versuch, die Stämme nach ihrem Temperaturoptimum zu unterscheiden, ergab, daß die Rangordnung der Anfangsintensität aller *A. chroococcum*-Stämme bei drei verschiedenen Temperaturen (30, 18–21 und 15 ° C) die gleiche blieb wie bei normaler Bebrütungstemperatur von 30 ° C. Bei niedriger Temperatur ist der Verlauf der Entwicklung natürlich im ganzen verlangsamt. Im Gegensatz zu den *A. chroococcum*-Stämmen reagierten die beiden Stämme der anderen Arten anders. Der Stamm von *A. vinelandii* wächst bei 15 ° in Nährlösung fast überhaupt nicht, während er bei 30 ° zu den aktivsten Stämmen gehört. *A. Beijerinckii* hat dagegen bei 30 ° eine geringe Anfangsintensität, zeigte jedoch im Gegensatz zu allen anderen Stämmen bei 15 ° frühestes und bestes Wachstum.

In gleicher Weise wurde auch das Verhalten der Stämme gegenüber verschiedenem pH-Wert geprüft. Bei etwa pH 6,0 war bei allen Stämmen die untere Grenze der Entwicklungsmöglichkeit in Nährlösung erreicht. Auf entsprechendem Agar war dagegen das Wachstum noch recht gut. Auf Nähragar zeigten alle Stämme bis pH 9,0 üppiges Wachstum, in gleicher Nährlösung jedoch kaum Entwicklung. Auf Nähragar pH > 8,0 waren Farbstoffbildung und Schleimproduktion verstärkt. Auf stark alkalischem Nährboden bildete *A. vinelandii* den bekannten grünen Farbstoff nicht (vgl. BORTELS 3).

6. Die Anpassung der Stämme an bestimmte Kohlenstoffquellen.

Die Prüfung erfolgte durch Trockensubstanzbestimmung⁸ in Normallösung ohne Agar mit 2 % der zu prüfenden Kohlenstoffquellen (für Natriumbenzoat auch 0,5 %, vgl. in III, 3) nach genügend langer (bis 21 Tage), maximales Wachstum erlaubender Kulturdauer.

Es können hier zusammenfassend nur die grundsätzlichen Ergebnisse behandelt werden: Auf Grund ihrer Verarbeitbarkeit lassen sich 4 Gruppen von Kohlenstoffquellen aufstellen: 1. Ein Teil der Kohlenstoffquellen wird von allen Stämmen gut verarbeitet, höchstens von einigen Ausnahmen etwas schlechter, und zwar in der Reihenfolge ihrer Eignung: Mannit, Glykose, Saccharose (reinst), Rübenzucker (Haushaltszucker), Maltose, Raffinose, lösliche Stärke, Dextrin, Inulin, Äthylalkohol, Natriumbenzoat 0,5 % (jedoch nicht in Konzentration 2 %, vgl. in III, 3). — 2. Andere Kohlenstoffquellen werden ohne Ausnahme schlecht verarbeitet: Mannose, Natriumacetat, Ca-malat, Natriumbutyrat. — 3. Weitere Kohlenstoffquellen werden von fast allen Stämmen überhaupt nicht verarbeitet, jedoch von einigen wenigen Stämmen als Aus-

⁸ Nach MEYERHOF und BURK gehen Bakterienzahl, Trockengewicht und Stickstoffgehalt in stickstofffreier Nährlösung parallel, was auch im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden konnte.

nahme zum Teil sehr gut: Milchzucker (3)⁹, Glycerin (2, *Stamm IB* und der Stamm von *A. vinelandii*), Natriumbenzoat 2% (3). — 4. Die restlichen Kohlenstoffquellen werden von keinem Stamm verarbeitet: Arabinose, Xylose, Erythrit, Natriumoxalat.

Es sind nur verhältnismäßig wenige Stämme, die in den einzelnen Gruppen die Ausnahmen bilden und in der Mehrzahl solche, die sich auch in ihren sonstigen Eigenschaften hervorheben. Neben der 1. Gruppe ist vor allem die 3. Gruppe von Interesse. Denn es handelt sich dabei um die Verarbeitung von Stoffen, für die von verschiedenen Untersuchern widersprechende Ergebnisse vorliegen. Milchzucker wurde von drei Stämmen mit schwachem bis mittelgutem Wachstum ausgenutzt. Besonders interessant sind die Verhältnisse bei Glycerin. Bei fast allen Stämmen war die Nährlösung nach 21 Tagen noch vollkommen unverändert, nur *Stamm IB* und der Stamm von *A. vinelandii* verarbeiteten Glycerin bereits nach 12 Tagen in der gleichen maximalen Wachstumsstärke wie Glykose. (Je Gramm Glycerin 118.2 mg bzw. 102.7 mg Trockengewicht, entsprechend einem oft gefundenen Mittelwert von ungefähr 120,0 mg je Gramm Glykose.) — Für Äthylalkohol ergab sich im Durchschnitt der Stämme etwa 90,0 mg Trockengewicht je Gramm. — Lösliche Stärke, Dextrin, Glycogen, auch Inulin wurden im allgemeinen gut verarbeitet, doch ist der zeitliche Verlauf langsamer als bei den Mono- und Disacchariden.

Zusammenfassend kann man sagen, daß es Kohlenstoffquellen gibt, die allgemein für *Azotobacter* geeignet sind, andere dagegen nicht. Hier wie dort jedoch gibt es Ausnahmen bei gewissen Stämmen, die auf Grund einer physiologischen Anpassung anders reagieren. Klare Beziehungen dieser Eigenschaften zur Anfangsintensität ließen sich jedoch hier nicht feststellen.

7. Beziehungen zwischen den Eigenschaften der Stämme und ihrer Herkunft und der Art der Gewinnung.

Vergleicht man die aus Südhannover mit den aus dem Oberlahnkreis und den aus osteuropäischen Gebieten herkommenden Stämmen, so lassen sich gruppenweise keine grundsätzlichen Unterschiede feststellen. Hier wie dort verteilen sich die Eigenschaften nach ähnlichen Gesichtspunkten. Andererseits ist sehr bemerkenswert, daß sich von einer Entnahmestelle, sowohl bei zeitlich getrennter Prüfung, als auch aus einer Bodenprobe mehrere in ihren Eigenschaften vollkommen verschiedene Stämme gewinnen ließen (vgl. auch BRUCH-HIRSCHFELD). Ein besonders gutes Beispiel dafür gibt ein Erbsenbeet im Garten des Institutes für Mikrobiologie in Göttingen, aus dem bei insgesamt 3 Probenahmen im Verlaufe etwa eines Jahres allein fünf gut unterscheidbare Stämme gewonnen wurden.

Zum Teil wurden bei erneuten Probenahmen von den verschiedenen untersuchten Örtlichkeiten Stämme gleicher Eigenschaften wie bei früheren

⁹ In Klammern die Zahl der Ausnahmen.

Proben gefunden, z. T. waren die Stämme aber auch anders. Manchmal ließen sich auf abgewandelten Elektivsubstraten die gleichen Stämme gewinnen wie auf Normalagar, manchmal jedoch auch andere. Gesetzmäßigkeiten waren daraus nicht abzuleiten. Auch zwischen den Eigenschaften der Stämme und ihrer Herkunft ließen sich keine deutlichen Beziehungen feststellen. Eine gruppenweise Beziehung vor allem der vorher aufgezeigten Stammtypen zu Entnahmestellen gleichen Charakters war ebenso wenig offenbar wie eine Beziehung zum *pu*-Wert des Herkunftsortes, seiner geologischen Grundformation und Vegetation. Es muß jedoch beachtet werden, daß ausgesprochen alkalische Böden nicht zur Verfügung standen.

8. Die Wirkung verschiedener Stämme aufeinander.

Die Erkenntnis, daß ganz allgemein und zumal auch in einer Bodenprobe *Azotobacter*stämme vorkommen, die sich in ihren Eigenschaften deutlich unterscheiden, und daß diese Eigenschaften sich in über zweijähriger künstlicher Kultur vollkommen konstant hielten (vgl. S. 361, Anm. 5), mußte einmal zu der Frage führen, ob und wie Stämme verschiedener Eigenschaften in ein und demselben Boden aufeinander einwirken, zum andern, wie das gleichzeitige Vorhandensein solcher Abarten in einem Boden zu erklären ist, d. h. die Frage nach der Ursache der Varietätenbildung. Jedoch stehen beide Fragen zweifellos in einer gewissen Wechselbeziehung. Die Frage der Stammumwandlung wird im II. Teil eingehender behandelt. Über die erste Frage mußten u. U. Zusammenimpfungen in künstlicher Kultur gewissen Aufschluß geben können.

In der Folge wurde mit einigen besonders charakteristischen Stämmen gearbeitet, *Stamm G* und *Stamm KG₂* (= *A. vinelandii*, mit hoher Anfangsintensität, typischer Farbstoffbildung und Beweglichkeit im Vergleich zu den *Stämmen IB* und *J₄* mit geringer Anfangsintensität). Diese Stämme wurden einzeln oder in verschiedener Mischung in Normalmannit-, Normalglykose-lösung oder auf entsprechendem Agarnährboden wachsen gelassen.

Dabei zeigte sich eindeutig, daß der Charakter der Mischkultur immer durch den Stamm mit der größeren Anfangsintensität der Stickstoffbindung bestimmt wird, sowohl im Ergebnis der Stickstoffbindung, als auch in den makro- und mikroskopischen Merkmalen der Kultur (Art der Trübung der Nährlösung, der Verfärbung). Als Beispiel siehe einen von zahlreich durchgeführten ähnlichen Versuchen in Tab. II, besonders die charakteristischen Stickstoff-Werte nach zwei Tagen Wachstum.

Dabei macht *Stamm KG₂*, der eine etwa gleich hohe Anfangsintensität wie *Stamm G* besitzt, insofern eine Ausnahme, indem er in Mischkultur mit *Stamm G* vor allem das makro- und mikroskopische Aussehen der Kultur bei für beide Stämme normaler gleich hoher Stickstoffbindung bestimmt. Hier scheint die größere Beweglichkeit von *Stamm KG₂* von Bedeutung, die bedingt durch die Eigenart der einseitig optimalen künstlichen Kultur den Stamm mit der größeren Beweglichkeit befähigt, den gesamten Kulturraum früher in Besitz zu nehmen. Dadurch ist erneut der Zusammenhang der Beweglichkeit mit der hohen Anfangsintensität aufgezeigt.

Weitere Hinweise ergaben sich aus den bei Rückisolierungen aus Mischkulturen gewonnenen Beobachtungen. Dabei wurden aus Mischkulturen von zwei oder drei Stämmen (*G*, *IB* und *KG₂*) nach verschieden langer Passagenzahl insgesamt 118 Rückisolierungen vorgenommen,

Tabelle II. *Stickstoffbindung einiger Stämme allein und in Mischkultur nach 2 und 7 Tagen Wachstum.*

Stamm	Stickstoffverbindung in mg			
	2 Tage Wachstum		7 Tage Wachstum	
	Parallelen	Mittel	Parallelen	Mittel
<i>G</i>	14,43	13,51	18,01	17,94
	12,58		17,86	
<i>IB</i>	0,71	0,93	17,86	17,22
	1,14		16,57	
<i>K G₂</i>	10,86	10,29	16,86	16,86
	9,71		ausgef.	
<i>J₄</i>	4,00	3,36	19,86	19,08
	2,72		18,29	
<i>G + IB</i>	13,86	13,29 ¹⁰	18,01	18,01
	12,72		ausgef.	
<i>K G₂ + IB</i>	11,15	11,58 ¹¹	17,01	16,58
	12,00		16,15	
<i>J₄ + IB</i>	4,00	4,08 ¹²	18,01	17,44
	4,15		16,86	
<i>G + K G₂</i>	12,00	12,65 ¹³	16,86	17,29
	13,29		17,72	
<i>G + K G₂ + IB</i>	13,00	12,22 ¹²	17,01	16,94
	11,43		16,86	

Behandlung: Normalmannitlösung mit 0,1 % Agar, 50 cem in 250er Erlenmeyer. Impfung von 2 Tage alter Normalagarkultur. Temperatur 30° C. Stickstoffbestimmung nach KJELDAHL.

die sich alle auf Grund ihrer Merkmale als die vorher eingepfimpften Stämme identifizieren ließen. Es fand sich kein Stamm mit neuen Eigenschaften.

Da von verschiedenen Autoren Kopulation (Konjunktion) von Mikroorganismen (FOERSTER, POTTHOFF) bezw. eine Art sexueller Vorgang (STAPP)

¹⁰ Charakter von Stamm *G*.

¹¹ Charakter von Stamm *KG₂*.

¹² Charakter von *J₄*.

¹³ Charakter von *KG₂*, aber im makro- und mikroskopischen Aussehen deutlich, daß nicht allein vorhanden.

beobachtet sein soll und auch für *Azotobacter* das berichtet wurde (Bespprechung bei NIEMEYER), war nämlich zu überlegen, ob auf solchem Wege nicht aus zwei verschiedenen Stämmen ein Stamm mit neuen Eigenschaften erscheinen könnte.

In wiederholten Versuchsserien wurden die Mischkulturen bis zu 10 Passagen viele Wochen lang geführt und dabei fortlaufend Rückisolierungen vorgenommen. Dabei war der Stamm mit der geringen Anfangsintensität meist schon nach der zweiten Passage nicht mehr aufzufinden, während bei Mischkultur von zwei Stämmen mit hoher und einem mit geringer Anfangsintensität die beiden ersteren noch nach sieben Passagen rückisoliert werden konnten. Ebenso blieben zwei Stämme mit ungefähr gleicher geringer Anfangintensität während mehrerer Passagen im Gleichgewicht.

Diese Beobachtungen erscheinen verständlich, da der Stamm mit der größeren Anfangsintensität befähigt ist, im Konkurrenzkampf um die Nährstoffwirkung (RIPPEL und LOHRMANN) diese bereits im vollen Maße auszunutzen, noch ehe der andere Stamm sich dazu anschicken kann. Diese Auslesewirkung im Kampf um die maximale Ausnutzung der optimalen Lebensbedingungen tritt so ausgesprochen in Erscheinung, daß, wie die Rückisolierungen zeigten, dem Stamm mit der geringen Anfangsintensität sehr bald die Existenzmöglichkeiten entzogen sind und er nach fortlaufender Abnahme schließlich aus der Mischkultur verschwindet.

9. Die natürlichen Verhältnisse im Boden.

O. v. METZEN zeigte an Rohkulturen aus Bodenproben mit extremen Merkmalen, daß die Stickstoffbindungsfähigkeit eines Bodens viel mehr durch die Schnelligkeit der Stickstoffbindung als durch die absolute Höhe gekennzeichnet ist. Vergl. hierzu auch WINOGRADSKY 8). Als Ursache sieht er das Vorhandensein von *Azotobacter*-Stämmen mit unterschiedlichen Eigenschaften an, die sich durch ökologische Bedingungen gegebenenfalls kurzfristig umwandeln können.

Die eigenen Untersuchungen zeigten nun tatsächlich auch an Rein-kulturen das Vorhandensein von unterschiedlichen *A. chroococcum*-Stämmen, sogar in einer Bodenprobe. Sie blieben aber in langer künstlicher Kultur konstant. Unter weiterem Hinweis auf die Ergebnisse der Mikroökologie [Methoden der direkten Beobachtung der Mikroorganismen am natürlichen Standort, CONN, WINOGRADSKY (1), ROSSI, CHOLODNY, KUBIENA] braucht zur Erklärung des Vorhandenseins verschiedener Stämme auf eng begrenztem ökologischen Standort eine kurzfristige Umwandlung nicht angenommen zu werden (siehe jedoch im II. Teil dieser Arbeit).

Die in den Versuchen über das Zusammenimpfen aufgezeigten Verhältnisse gelten natürlich nur in der künstlichen Kultur. Hier kommt die bedeutend vielgestaltigere Auslesewirkung der mannigfach zusammenwirkenden Faktoren des Bodens nicht zustande, und in der einseitig optimalen künstlichen Kultur ist so die Rangordnung der

Wirkung der einzelnen Stämme allein durch die größere Anfangsintensität der Stickstoffbindung bedingt. Es kann also angenommen werden, daß je nach den augenblicklichen optimalen Bedingungen im Boden die Rangordnung der Wirksamkeit der Stämme auch anders sein kann. Die spezifische Stickstoffbindungsfähigkeit eines Bodens wäre dementsprechend als das durch die begrenzenden Faktoren des Bodens induzierte maximale Wirksamwerden eines oder mehrerer Stämme mit entsprechender Spezialanpassung anzunehmen, die schon vorher mehr oder weniger latent vorhanden sind. Hinweise dafür gibt auch das Vorhandensein von Stämmen mit ihrer Anpassung an bestimmte Kohlenstoffquellen (z. B. Glycerin)¹⁵ und unterschiedliche Intensität bei verschiedener Temperatur (siehe vorher).

II. Zur Frage der Stammumwandlung bei *Azotobacter chroococcum*.

1. Prüfung chemogenetischer und anderer Faktoren.

Weitere Hinweise zu den im I. Teil dieser Arbeit erörterten Ergebnissen mußten u. U. auch Untersuchungen über die Umwandelbarkeit der Stämme in ihren charakteristischen Eigenschaften geben können.

Nachdem die Wirkung von Colchicin in der pflanzlichen Genetik zur Erzielung polyploider Rassen häufig angewendet wurde, fand auch eine Prüfung der Wirkung auf einzellige Organismen und Bakterien statt, die jedoch ohne Wirkung blieb (zuletzt STAPP, dort auch Literatur). Dagegen fand BAUCH (1—4) Wirksamkeit von Campher, Acenaphten, Narcotinhydrochlorid und anderen carcinogenen und phytohormonalen Stoffen bei *Hefen*.

In eigenen ausgedehnten Versuchen wurde während einer Dauer von 1½ Jahren die Wirkung von Campher, in etwas geringerem Maße auch von Acenaphten, Narcotinhydrochlorid und Colchicin an einigen charakteristischen Stämmen von *A. chroococcum* (Stamm G, IB und J₄) und einem Stamm von *A. vinelandii* (Stamm KG₂) geprüft.

Diese Stämme waren aus mit dem Mikromanipulator gewonnenen Einzelkulturen hervorgegangen und in ausgedehnten und sorgfältigen Versuchen zunächst auf ihre Homogenität und auf die auch in solchen Kulturen zu erwartenden normalen Schwankungen der Merkmale geprüft worden, um die tatsächlichen Wirkungen der vorgenannten Stoffe genügend scharf beurteilen zu können. — Die Technik der Versuche mit Campher und Acenaphten war die gleiche wie bei BAUCH und STAPP. Mit Colchicin und Narcotinhydrochlorid wurde in Nährlösung gearbeitet. Die Stämme wurden in bis zu zahlreichen Passagen geführt und die Dosis der Substanzen von minimalen bis zu sehr großen Mengen variiert. Es wurden insgesamt viele Hundert solcher Kulturen geführt und ausgewertet und bei vielen daraus gewonnenen Abtrennungen auch die Stickstoffbindung getestet.

Es braucht zusammenfassend hier nur gesagt zu werden, daß die Versuche insgesamt ohne Hinweis auf eine Wirkung der geprüften

¹⁵ REUSZER fand z. B., daß durch hohe Gaben an Benzoesäure die normale *A. chroococcum*- und *A. Beijerinckii*-Flora von einer *Azotobacter*art verdrängt wurde, die er vorher in dem Boden nicht beobachtete.

Stoffe auf *Azotobacter* blieben. Ebenso blieben Versuche zur Änderung von Stämmen durch Anpassung an bestimmte Temperaturen, pH und bestimmte Kohlenstoffquellen erfolglos.

2. Die Wirkung von gebundenem Stickstoff auf *Azotobacter*.

Daß *Azotobacter* nicht nur den elementaren Stickstoff der Luft assimilieren kann, sondern auch Nitrate, Ammoniakstickstoff, Pepton u. a., ist bekannt, ebenso, daß die Assimilation des elementaren Stickstoffes eingestellt wird, wenn eine bestimmte Konzentration an vorhandenem gebundenem Stickstoff überschritten wird (BURK und LINEWEAVER, KOSTYSCHEW und Mitarbeiter).

Gelegentlich wurde sogar die Annahme ausgesprochen, daß die Verarbeitung von gebundenem Stickstoff die für *Azotobacter* normale Form der Stickstoffaneignung sei. Es konnte gezeigt werden, daß *Azotobacter* auch noch bei hohen Konzentrationen an gebundenem Stickstoff leben kann. STAPP und RUSCHMANN fanden die Grenzkonzentration in Nährlösung mit Leitungswasser für Ammoniumnitrat = 1,60%, für Natriumnitrat = 1,91%, für Kaliumnitrat = 2,02%. Gegen Nitrite war *Azotobacter* dagegen äußerst empfindlich. DEN DOOREN DE JONG stellte fest, daß verschiedene Stämme unterschiedlich gegenüber Kaliumnitrat disponiert sind. Bei 5% war überhaupt kein Wachstum, bei 3% zeigten die meisten Stämme kein Wachstum, bei 2% je nach den Stämmen unterschiedlich, ebenso bei 1 und 0,5%. Etwas weniger giftig zeigte sich Ammoniumsulfat. Nach OMELIANSKI und SSEWEROWA soll Pepton in Mengen von 0,5% hemmend wirken. STAPP und RUSCHMANN konnten jedoch keinen Einfluß von 1% feststellen, ebenso fand DEN DOOREN DE JONG auf Agar mit 3% Pepton noch Wachstum, auch bei Zugabe von anderen organischen stickstoffhaltigen Stoffen wie Fleischwasser, Ascitesflüssigkeit und Pferdeserum vorzügliches Wachstum, jedoch nicht bei Zugabe von Hammelblut.

Eine andere Frage ist natürlich, wie die Kulturen auf solchen Nährsubstraten beeinflußt werden:

Das Aussehen der Kulturen auf Nährmedien mit geringen Stickstoffgaben war nach STAPP und RUSCHMANN normal. Mit steigenden Nitratgaben fanden sich aber stärker teratologische Formen. Auch DEN DOOREN DE JONG fand bei 0,1% der verschiedensten Stickstoffverbindungen keinen Einfluß auf das Wachstum von *Azotobacter*. Die Lebensdauer von Kulturen auf stickstoffhaltigem Substrat wird jedoch kürzer angegeben.

In Zusammenhang mit der vorliegenden Fragestellung ist von besonderer Bedeutung, ob die Eigenschaften eines *Azotobacter*-Stammes durch Wachstum auf Nährboden mit gebundenem Stickstoff beeinflußt wird, bzw. ein Stamm in seinen Eigenschaften dadurch dauernd geändert werden kann.

KOSTYSCHEW und Mitarbeiter fanden, daß jahrelang im Laboratorium auf stickstofffreiem Substrat gezüchteter *A. agilis* die volle Fähigkeit besaß, molekularen Stickstoff zu binden. Nach 20 Überimpfungen in Nährlösung mit Ammoniumsulfat war das Wachstum sehr gehemmt, nach 24 gar kein Wachstum auf diesem Nährmedium zu erzielen. Auf stickstofffreies Substrat gebracht wurde aber genau so gut molekularer Stickstoff assimiliert wie durch die Kontrolle.

DEN DOOREN DE JONG untersuchte die Wirkung von hohen Gaben an gebundenem Stickstoff. Er zeigte, daß *Azotobacter* auf festem Nährboden mit hohen Gaben an gebundenem Stickstoff sehr typische Abänderungen der Form erleidet, die aber bei Impfung auf ein normales Medium wieder verschwanden. In flüssigen Nährmedien mit „tierischem Stickstoff“ (Peptonwasser, Bouillon, Fleischwasser) konnten aber bleibende Veränderungen der Form auftreten. Bei einem Stamm war sogar die Fähigkeit der Stickstoffbindung verloren gegangen. Bei Abstrich auf eine Platte mit normalem Nährboden gewannen aber einige Kolonien die Fähigkeit zurück, den elementaren Stickstoff der Luft zu binden.

Einige zufällige Beobachtungen führten auch mich dazu, die Wirkung von gebundenem Stickstoff auf die Eigenschaften der Stämme zu prüfen. *Stamm J₄*, der seit Jahren in der Institutssammlung bei vierwöchentlicher Überimpfung auf STAPP-RUSCHMANN-Nitratagar¹⁶ geführt worden war und angeblich ein gutes Stickstoffbindungs-Vermögen besaß, blieb im Vergleich zu anderen neu gewonnenen und auf Normalagar geführten Stämmen, selbst bei der verhältnismäßig langen Kulturdauer von 7—14 Tagen, deutlich hinter der maximalen Stickstoffbindung dieser Stämme zurück. Es wurde deshalb nach der bisherigen Vorstellung zunächst angenommen, daß es sich bei *Stamm J₄* um einen schlechten N-Binder handele, bezw. daß die Stickstoffbindungsfähigkeit durch die langdauernde künstliche Kultur reduziert worden sei und das Kaliumnitrat des STAPP-RUSCHMANN-Nitratagars womöglich dafür verantwortlich zu machen wäre.

Diese Meinung schien dadurch gestützt zu werden, daß es gelang, durch mehrere kurzfristige Passagen von *Stamm J₄* auf stickstofffreiem Normalagar dessen Stickstoffbindungsfähigkeit zu ändern. Es ergab sich, daß *Stamm J₄* wirklich ein gutes Stickstoffbindungsvermögen besitzt, dessen Maximalwert mit dem der anderen Stämme übereinstimmt (im üblichen Test nach 7 Tagen Wachstum). Andererseits gehört jedoch *Stamm J₄* zu den Stämmen mit geringerer Anfangsintensität (etwa 3 mg N nach 2 Tagen Wachstum; erstes Maximum der Variationskurve in Abbildung 5), was natürlich bei der folgenden Beurteilung berücksichtigt wird.

Stamm J₄ wurde seit Januar 1944 auch auf Normalagar mit 0,1, 0,5 und 1% Kaliumnitrat geführt und diese Kulturen wurden nach bestimmten Zwischenräumen geprüft. Die Beobachtungen waren nicht immer so deutlich wie mit dem seit langem durchgehend auf STAPP-RUSCHMANN-Nitratagar gezüchteten *Stamm J₄*. Auffallend war, daß in Kulturen von den Nährböden mit hohen N-Konzentrationen die Wirkung gerade oft sehr wechselnd erschien oder auch ausblieb. Doch war die Wirkung grundsätzlich vorhanden.

Es ergab sich, daß sich die Wirkung des Nitrates in einer Hemmung der Anfangsintensität der Stickstoffbindung in stickstofffreiem Nährmedium äußert, nicht wie aus den ersten Beobachtungen angenommen

¹⁶ 0,04% Kaliumnitrat, 0,08% Calc. glycerino-phosphoric. solub., 0,338% Chlornatrium, 0,01% Chlorkalium, 0,054% Magnesiumsulfat, 0,092% Magnesiumchlorid, 2% Mannit und NaOH bis Lösung gegen blauen Lackmus neutral ist.

worden war, in einer Beeinträchtigung der maximalen Stickstoffbindung. Solche gehemmten Kulturen erreichten bei genügend langem Wachstum denselben maximalen Wert wie die Vergleichskulturen von Normalagar. Bei den ersten Beobachtungen waren die Kulturen also noch nicht voll ausgewachsen. Ein weiterer Beweis für die Wirkung des Stickstoffes in der Vorkultur ist, daß sie sich durch 2—4 Passagen auf Normalagar reaktivieren ließen, nicht aber auf gleichem Agar mit Nitratsstickstoff. Man vergleiche hierzu zwei Versuchsserien von zahlreichen ähnlichen Versuchen, die hier nicht alle aufgeführt werden können, in den Tabellen III und IV, z. B. normale Kultur bei 1., ge-

Tabelle III. *Stickstoffbindung von Stamm J₄ nach Passagen auf Nährmedien mit gebundenem Stickstoff im Vergleich zu Passagen auf Normalagar.*

50 ccm Normallösung mit 0,1 % Agar in 250er Erlenmeyer, Stickstoffbindung in mg (Januar 1944).

Vorkultur und Behandlung	Wachstum					
	2 Tage		7 Tage		14 Tage	
1. Von Normalagar	2,86 3,14	3,00	19,01 18,72	18,87	18,43 17,29	17,86
2. Von Stapp-Ru-Ni-Agar, 4-wöchentlich.	0,14 0,71	0,43	12,57 16,72	14,65	19,86 20,15	20,01
3. Wie vorher, in Nährlösung geführt.	0,00 1,14	0,57	11,72 16,15	13,94	18,73 20,58	19,65
4. Wie 2. etwa 8-täglich überimpft.	1,00 0,57	0,79	18,43 15,29	16,86	18,86 17,72	18,29
5. Von Normalagar mit 0,1% KNO ₃ , 4-wöchl. überimpft.	1,00 0,00	0,51	17,29 16,00	16,65	20,15 18,01	19,08
Außerdem:						
6. Zu 2. in Normallösung ohne Agar geprüft.	0,00 0,14	0,07	5,43 8,86	7,15	13,72 19,01	16,37
Nach weiteren Passagen wurden erneut Impfkulturen der vor- stehenden Tabelle geprüft, z. T. nach Wechsel des Nährbodens.						
7. Zu 2. nach 2 je 8-tägigen Passagen auf Normalagar.	3,86 4,00	3,93	18,86 19,29	19,08	18,86 17,01	17,94
8. Wie vorher, auf Stapp-Ru- Ni-Agar.	0,14 1,00	0,57	15,15 17,01	16,08	19,01 20,15	19,58
9. Zu 5. wie 7.	2,00 1,29	1,56	ausgef. 15,72	15,72	20,15 18,29	19,22
10. Zu 5. wie 7., doch auf Normalagar mit 0,1% KNO ₃ .	3,29 1,00	2,15	16,00 17,01	16,51	ausgef. 18,29	18,29
11. Nach weiteren 2 Passagen wie 7.	3,86 4,72	4,29 ¹⁷	20,58 20,00	20,29	18,86 19,72	19,29
12. Zu 10. nach weiteren 2 Passagen wie 10.	ausgef. 0,57	0,57	16,86 13,15	15,01	ausgef. 20,58	20,58

¹⁷ Diese regenerierte Kultur wurde dann als Hauptstamm auf Normalagar weitergeführt und in folgenden Versuchen als Kontrolle benutzt. Sie zeigte dann in allen weiteren Prüfungen normale Ergebnisse.

hemmte bei 2., reaktivierte Kultur bei 7. und 11., gehemmte Kontrollen bei 8. und 12. in Tabelle III.

Weniger deutlich und vor allem viel wechselnder oder auch ohne jedes Ergebnis war die Prüfung einiger daraufhin ebenfalls auf STAPP-RUSCHMANN-Nitratagar und Normalagar mit verschiedenen Konzentrationen Kaliumnitrat (z. T. auch in entsprechenden Nährlösungen) gezüchteter Stämme.

Bei den Stämmen *KG₂* und *IB* ließ sich keine Wirkung feststellen, obwohl die typischen morphologischen Stickstoff-Involutionsformen und die folgend noch zu besprechende Verkürzung der Lebensdauer vor allem bei hohen Stickstoffkonzentrationen vorhanden waren wie bei den anderen Stämmen. — Bei Stamm *G* und *IVB* waren während der ersten 5 bzw. 4 Monate ebenfalls keine Wirkungen festzustellen, dann fanden sich mehr oder weniger wechselnd bei z. T. nur geringen Unterschieden gegenüber der Kontrolle die vorgenannten Hemmungen, auffallenderweise jedoch nur in den 4-wöchentlich überimpften Kulturen, nicht aber in kurzfristig und häufig überimpften. Außerdem brachte keineswegs eine höhere Stickstoffkonzentration in der Vorkultur eine deutlichere Wirkung hervor, sondern gerade sehr schwankende Ergebnisse (wie es auch vorher schon bei Stamm *J₄* beobachtet wurde) vor allem auch innerhalb der Parallelen. Womöglich sind aus solchen Wirkungen der Vorkultur auch Unregelmäßigkeiten zu erklären, wie sie RIPPPEL (23) bei Untersuchungen über die Agarwirkung beobachtete.

Tabelle IV. Weitere Prüfungen von Stamm *J₄* nach Passagen mit unterschiedlicher Behandlung (Oktober 1944). Anordnung wie in Tabelle III.

Vorkultur und Behandlung	Wachstum			
	2 Tage		7 Tage	
1. Von Normalagar 4-wöchentlich überimpft.	3,60	4,03	21,04	20,18
2. Von Stapp-Ru-Ni-Agar 4-wöchentlich.	0,29	1,52	13,55	14,85
3. Von Normalagar mit 0,1% KNO_3 , 4-wöchentlich.	0,86	2,31	15,71	15,64
4. Normalagar mit 0,5% KNO_3 , etwa 14-täglich.	1,44	2,24	17,44	17,01
5. Normalagar mit 1% KNO_3 , wie vorher.	2,88	3,10	18,30	17,58
6. Zu 2. nach 2 Passagen auf Normalagar.	3,46	3,75	19,60	20,18
7. Zu 3. wie vorher.	4,03		20,75	
	1,87	1,37 ¹⁸	16,57	17,20
8. Zu 7. nach weiteren 2 Passagen auf Normalagar.	0,86		18,01	
	2,88	3,53	20,17	19,60
	4,18		19,02	

Ein Versuch sei in diesem Zusammenhang jedoch noch besonders erwähnt. Von Kulturen von Stamm *G*, die seit Januar 1944 in vierwöchentlicher

¹⁸ Hemmung noch nicht überwunden, neuer Ansatz nach zwei weiteren Passagen in 8.

Überimpfung auf STAPP-RUSCHMANN-Nitratagar und Normalagar als Kontrolle geführt worden waren, wurden im August 1944 Kulturen zur Stickstoffbindungsprüfung nach 2 und 7 Tagen angesetzt. Es wurde von den aus der drittletzten Überimpfung stammenden Kulturen (beinahe 3 Monate alt) geimpft.

Die Ergebnisse waren überraschend (Tabelle V). Die von Normalagar geimpften Kulturen zeigten normale Stickstoffwerte, die von STAPP-RUSCHMANN-Nitratagar geimpften Kulturen nach Abzug der Blindprobe praktisch keinen Stickstoffgewinn, selbst nach 7 Tagen Wachstum.

Das hätte von einem Abgestorbensein der Impfkultur auf STAPP-RUSCHMANN-Nitratagar herrühren können. Jedoch zeigte die eine der zweitägigen Parallelen mikroskopisch geringes Wachstum, bei den 3 übrigen Kolben ließ sich das nicht mit Sicherheit entscheiden. Die Kulturen waren aber auch gleichzeitig auf 2 Normalagar- und 2 STAPP-RUSCHMANN-Nitratagarröhrchen geimpft worden. Interessanterweise war auf dem STAPP-RUSCHMANN-Nitratagar geringes Wachstum vorhanden, auf Normalagar jedoch nicht.

Tabelle V.
Stickstoffbindungsprüfungen bei Stamm G von verschiedener Vorkultur.

Vorkultur und Behandlung	N-Bindung in mg			
	2 Tage Wachstum		7 Tage Wachstum	
1. Von Normalmannitagar, Impfkultur 3 Monate alt.	11,72 12,15	11,94	17,86 17,43	17,65
2. Von Stapp-Ru-Ni-Agar wie 1.	0,72 0,29	0,51	0,21 0,07	0,14
Nach einer Passage auf Normalagar (Impfkultur 8 Tage alt)				
3. Zu 1.	10,86 11,57	11,22	18,01 18,58	18,30
4. Zu 2.	6,72 9,43	8,08	15,86 18,29	17,08
Nach zwei weiteren 7-tägigen Passagen auf Normalagar:				
5. Zu 3. und 1.	11,86 11,15	11,51	18,86 17,58	18,22
6. Zu 4. und 2.	10,86 12,15	11,51	18,01 17,72	17,87
Von Stapp-Ru-Ni-Agar wie 2. aber nach zwei weiteren dazwischenliegenden 7-tägigen Passagen auf demselben Nährboden:				
7. Von Stapp-Ru-Ni-Agar, zu 6. 4. und 2.	8,00 4,43	6,22	16,58 18,29	17,44

Entsprechende Blindwerte wurden vorher abgezogen.

Man könnte annehmen, daß bei diesem Versuch ein Zeitpunkt der Abimpfung getroffen wurde, bei dem die Impfkulturen entweder soweit ab-

gestorben oder an gebundenen Stickstoff angepaßt bzw. geschädigt waren, daß auf stickstofffreiem Nährboden kein Wachstum mehr möglich war. (Vergl. hierzu die Angaben von RUBENTSCHIK und ROJSIN und von DEN DOOREN DE JONG). Abstriche von den STAPP-RUSCHMANN-Nitratagarröhrchen wuchsen wieder auf Normalagar. In je zwei von diesen Röhrchen beimpften Kolben mit Normal-lösung machten sich beim Stickstoffbindungstest die vorher beschriebenen Hemmungen bemerkbar, die bei erneutem Ansatz nach zwei weiteren Passagen auf Normalagar aber wieder verschwunden waren, nach zwei Passagen auf STAPP-RUSCHMANN-Nitratagar jedoch nicht. (Siehe Tabelle V).

Noch mehrmals wurden Kulturen von 3 Monate alten, auch älteren oder jüngeren Impfkulturen wie vorher angesetzt. Vorige Beobachtung konnte genau nicht mehr verfolgt werden. Entweder waren die Impfkulturen nicht mehr entwicklungsfähig oder es ergaben sich gehemmte oder normale Stickstoffwerte.

Vorausgesetzt, daß die Hemmung der Anfangsintensität entweder als eine Schädigung durch gebundenen Stickstoff oder als eine Anpassung an gebundenen Stickstoff angesehen werden mußte, so erschien es möglich, daß ein Stamm, der direkt bei der Gewinnung aus einer Bodenprobe und bei fortdauernder Züchtung auf einem Nährboden mit Nitrat gewachsen war, deutlicher die vorigen Ergebnisse bestätigen könnte.

Zu diesem Zwecke wurden im September 1944 aus dem Garten des Institutes für Mikrobiologie in Göttingen (Erbsenbeet, siehe oben I, 7) auf unterschiedlichen Nährböden 8 Stämme gewonnen, darunter die 4 Stämme *0,04-Ni*, auf STAPP-RUSCHMANN-Nitratagar, *0,1-Ni*, *0,5-Ni* und *1,0-Ni* auf Normalagar mit entsprechenden Konzentrationen Kaliumnitrat. Die Gewinnung dieser Reinkulturen auf den wenig elektiv wirkenden stickstoffhaltigen Nährböden war äußerst schwierig und zeitraubend.

Bei sofortiger Prüfung der Stämme ergaben sich in den ersten Ansätzen keine Hinweise für eine Wirkung der speziellen Elektivkultur: es konnten weder direkt Stämme mit besonderen Eigenschaften aus dem Boden gewonnen werden noch war eine Wirkung auf Nährböden mit Kaliumnitrat festzustellen. Nach einigen Monaten der „Vorkultur“ auf den vorgenannten Nährböden zeigten die Stämme *0,5-Ni* und *1,0-Ni* jedoch eine deutliche Hemmung, die nach 3 Passagen auf Normalagar noch andauerte. Die Stämme *0,04-Ni* und *0,1-Ni* zeigten dagegen bis dahin noch keine Hemmung. In einem folgenden Ansatz zeigte nur Stamm *0,5-Ni* geringe Wirkung nach 2 Tagen Wachstum bei Unregelmäßigkeit der Parallelen¹⁹. Nach weiteren Passagen wurden im Februar und März 1945 erneut Kontrollen vorgenommen. Sie blieben ohne Ergebnis. (Siehe jedoch unten.)

Im April und Mai 1945 konnte durch die äußeren Ereignisse während 11 Wochen nicht überimpft werden. Stamm *0,04-Ni* und *0,1-Ni* waren danach noch entwicklungsfähig, die Stämme *0,5-* und *1,0-Ni* nicht mehr. Ebenso waren die anderen auf hohen Stickstoffkonzentrationen geführten Stämme in Verlust geraten, während die entsprechenden Parallelkulturen auf Normalagar auch weiter zur Verfügung blieben.

¹⁹ Von Normalagar 2 Tage Wachstum: 8,36/7,49, Mittel 7,93, 7 Tage Wachstum: 18,01/17,72, Mittel 17,87. Von Normalagar mit 0,5% Kaliumnitrat 2 Tage Wachstum: 6,63/4,19, Mittel 5,41, 7 Tage Wachstum: 17,87/16,43, Mittel 17,15.

Die Versuche mit den Stämmen 0,04-Ni, 0,1-Ni, 0,5-Ni und 1,0-Ni waren also im ganzen unbefriedigend geblieben. Vor allem hatte sich nicht zeigen lassen, daß sich auf Elektivnährböden mit Nitrat ohne weiteres Stämme entsprechender Eigenschaften aus einem Boden gewinnen lassen. Andererseits konnte auch hier, obwohl die Stämme nicht in wünschenswerter Dauer beobachtet werden konnten, gezeigt werden, daß sich bei genügend langer Weiterführung der Stämme auf Nitrat ebenfalls die Hemmung der Anfangsintensität bemerkbar macht. Für die Beurteilung der Ergebnisse muß ebenfalls auch die unterschiedliche Disposition verschiedener Stämme gegenüber gebundenem Stickstoff Berücksichtigung finden (STAPP und RUSCHMANN und DEN DOOREN DE JONG, siehe oben Literaturbesprechungen).

Auf eine weitere Beobachtung von Bedeutung muß noch hingewiesen werden. Ab Ende 1944 mußten die meisten dieser Passagen mit Glykose anstelle des vorher benutzten Mannits geführt werden, der nicht mehr zu beschaffen war. Auffallend war, daß von diesem Zeitpunkt an bei Prüfungen der Kulturen die Hemmung nur noch unregelmäßig erschien, bis dann gefunden wurde, daß sie nur noch bei Kulturen eintrat, die von Nährboden mit Nitrat + Mannit geimpft wurden, während sie bei Impfung von einem Nährboden mit Nitrat + Glykose nicht mehr erschien.

Man kann darum annehmen, daß die vorher beobachtete Stickstoffwirkung auch in einem gewissen Zusammenhang mit der jeweiligen Kohlenstoffquelle (bzw. den Zwischenstufen ihres Abbaus) steht (vergl. hierzu auch NILSSON) und eine vorher bestehende Hemmung im Mechanismus der Stickstoffbindung bei Wechsel der Kohlenstoffquelle nicht unbedingt weiter wirksam ist oder erst durch neue entsprechend lange Vorkultur eine neue Anpassung wirksam werden muß. Die wenigen Beobachtungen ohne bestimmtere Wirkungshinweise erlauben natürlich noch keine genaueren Schlüsse in dieser Richtung. Dazu sind weitere Untersuchungen nötig. Es könnten sich auf diesem Wege wichtige Hinweise für den Stoffwechselmechanismus von *Azotobacter* und damit den Mechanismus der Stickstoffbindung ergeben.

Es ergab sich demnach, daß die künstlich induzierte Hemmung der Anfangsintensität durch Kaliumnitrat in der Vorkultur nicht beständig blieb, in den hier beobachteten Fällen also keine dauerhafte Änderung der Stammeigenschaft war. Nach spätestens 3 (in einem Fall 4) Passagen auf stickstofffreiem Nährboden wurde die normale Stickstoffbindungsfähigkeit wieder zurückgewonnen.

Diese Stickstoffwirkung scheint auch in einem gewissen Zusammenhang mit der kürzeren Lebensdauer von *Azotobacter* auf Nährboden mit gebundenem Stickstoff zu stehen. Bei Prüfung dieser Frage zeigte sich dann weiter, daß anscheinend noch andere Faktoren maßgebend sind (siehe auch vorher; Wechsel zwischen Mannit und Glykose). Es zeigte sich u. a., daß der Wassergehalt des Nährbodens zur Zeit der Beimpfung Bedeutung hat.

Impfte man z. B. auf Normalagarröhrchen mit 0,5 und 1,0% Kaliumnitrat, die 14 Tage oder 3 Wochen unter Watteverschluß bei Zimmertemperatur aufbewahrt und entsprechend ausgetrocknet waren, so wuchs *Azotobacter* sehr häufig überhaupt nicht an oder hatte im Vergleich zu Normalagarröhrchen, die ebenfalls eine entsprechende Zeit im Zimmer gestanden hatten, die jederzeit gut anwuchsen, und zu Kulturen auf frisch hergestellten Agarröhrchen, eine bedeutend geringere Lebensdauer. Sie betrug zuweilen nur 8—14 Tage. Feuchtigkeitsmangel wirkte also nicht an sich allein, sondern erst in Verbindung mit der KNO_3 -Wirkung verstärkend. Solche Kulturen zeigten auch gehäuft typische Stickstoff-Involutionsformen der Zellen (vergl. die Abbildungen bei DEN DOOREN DE JONG); schon STAPP und RUSCHMANN wiesen darauf hin, daß die Lebensdauer der Kulturen mit der Zahl der teratologischen Zellformen abnimmt.

Stamm G wurde auf Normalmannitagar und Normalglykoseagar nach 1-jähriger Aufbewahrung noch lebend gefunden, auf STAPP-RUSCHMANN-Nitratagar mehrmals nach 3 Monaten nicht mehr. Ähnlich verhielten sich die Kulturen auf Nährboden mit 0,1% Kaliumnitrat. Bis zu dieser Konzentration haben die Kulturen in der Zellform ein verhältnismäßig normales Aussehen. Bei stärkeren Konzentrationen kann man wohl kaum mehr von für *Azotobacter* normalen Verhältnissen sprechen, denn die Zellen erscheinen nur ganz zu Beginn des Wachstums normal. Wenn das Schwärmer- und Stäbchenstadium sich zum Kokkenstadium wandelt, beginnen sehr stark typische Stickstoffinvolutionsformen zu erscheinen. Die Lebensdauer solcher Kulturen auf Normalagar mit 0,5 und 1,0% Kaliumnitrat schwankte durchschnittlich zwischen 14 Tagen und 5 Wochen, und die Zeitspanne war, wie vorher schon gesagt, sehr von weiteren Außenfaktoren und solchen des Nährmediums abhängig.

Andere Stickstoffverbindungen wurden nicht geprüft. Nur über das Wachstum in Peptonbouillon können noch einige Angaben gemacht werden. Diese wurde in ausgedehntem Maße zu Reinheitsprüfungen der Stämme benutzt. In Peptonbouillon war kein ausgesprochenes Wachstum von *Azotobacter* zu beobachten. Diese blieb klar, abgesehen von einem sehr charakteristischen Bodensatz, der anomale Zellformen enthält mit zahlreichen der von anderen Autoren beschriebenen „Gonidienformen“, wobei die Zellen den Eindruck der Auflösung machen. Eigenartigerweise war durch Abimpfung von solchen 3 Monate alten Peptonbouillonröhrchen auf Normalagar sofort üppigstes und normales Wachstum der entsprechenden Reinkultur zu erhalten. Auch Stickstoffbindungsprüfungen zeigten nicht die Hemmungen wie bei der Vorkultur auf Kaliumnitrat.

Auf einige quantitative Versuche über Wachstum bei Gabe von Stickstoffverbindungen zur Nährlösung wird in anderem Zusammenhang am Schluß dieser Arbeit zurückgekommen.

Der Charakter der Farbstoffbildung wird auf Nährböden mit gebundenem Stickstoff (vergl. auch DEN DOOREN DE JONG) auffallend beeinflusst. Solche Kulturen zeichnen sich durch eine meist typisch hellere bis rotbraune Farbstoffbildung aus, in Abstufungen, entsprechend den benutzten Stämmen, jedoch nie durch ausgesprochen dunkle Töne. Diese Beobachtung hat u. U. Bedeutung für die Erklärung der Verteilung des für die einzelnen Stämme charakteristischen

Farbtypus in Beziehung zur Anfangsintensität der Stickstoffbindung, wie sie vorher besprochen wurde.

DEN DOOREN DE JONG stellte auf festem stickstoffhaltigem Nährboden typische Formveränderungen bei *Azotobacter* fest, die unter normalen Bedingungen jedoch wieder verschwanden, in flüssigen Nährmedien mit tierischem Stickstoff aber auch als Fixate erschienen. In einem Fall beobachtete er auch einen Verlust der Stickstoffbindungsfähigkeit, die in einigen Kolonien jedoch wieder regeneriert wurde.

Die vorliegenden Untersuchungen zeigten ebenfalls das Erscheinen von typischen Stickstoff-Involutionsformen, sowohl auf Nähragar, als auch in Nährlösung mit höheren Konzentrationen Kaliumnitrat. Diese Formveränderungen verschwanden regelmäßig sofort bei Impfung auf stickstofffreiem Normalagar. Doch konnte quantitativ gezeigt werden, daß eine Wirkung auf die Stickstoffbindungsfähigkeit solcher Kulturen vorhanden war, die sich in Form einer Hemmung der Anfangsintensität der Stickstoffbindung der in Vorkultur auf Nährboden mit Kaliumnitrat gewachsenen Kulturen äußerte. Das war auch schon bei längerer Vorkultur auf geringeren Mengen Kaliumnitrat (z. B. STAPP-RUSCHMANN-Nitratagar mit 0,04% KNO_3) der Fall, auf denen keine auffälligen Formveränderungen, jedoch eine etwas geringere Lebensdauer der Kulturen im Vergleich zu solchen auf stickstofffreien Nährmedien zu beobachten waren. Soweit die vorliegenden Beobachtungen zeigen, scheint für die Erzeugung der Wirkung weniger die Höhe der Konzentration an Kaliumnitrat als die Dauer der Vorkultur in Verbindung mit anderen Kulturfaktoren wichtig zu sein. Außerdem zeigte sich die Wirkung deutlicher bei Kulturen, die 4-wöchentlich überimpft wurden, im Gegensatz zu kurzfristig überimpften Kulturen. Die beobachteten Hemmungen der Wachstumsintensität verschwanden nach 2—4 Passagen auf stickstofffreiem Normalagar vollkommen.

Stellen wir zusammenfassend zunächst nochmals fest, daß sich einige diesbezüglich untersuchte Stämme als vollkommen homogen erwiesen, daß durch Mischkultur von Stämmen (gegebenenfalls über einen freilich völlig fraglichen Sexualakt) sich keine Stämme mit neuen Eigenschaften gewinnen ließen, daß sich für Campher, Acenaphthen, Narcotinhydrochlorid und Colchicin keine eigenschaftsändernde Wirkung feststellen ließ, daß Züchtung auf bestimmter Kohlenstoffquelle, auf extremem pH und bei unteroptimaler Temperatur keine Hinweise für eine nachwirkende Anpassung und Änderung der Eigenschaften ergab. Allein die oben erwähnte eigenschaftsändernde und einige Passagen lang andauernde Wirkung von gebundenem Stickstoff zeichnete sich ab.

Nachdem DEN DOOREN DE JONG Formveränderungen als Fixate feststellte, die bei den vorliegenden Untersuchungen nicht sichergestellt werden konnten, andererseits jedoch hier durch quantitative Beobachtungen eine Wirkung von Kaliumnitrat auf die Wachstumsintensität bestimmt werden konnte, die zwar durch Passagen auf stickstofffreiem Substrat wieder verschwand, erscheint es nicht unwahrschein-

lich, daß auch für diesen Fall die Möglichkeit des Entstehens von Fixaten gegeben ist.

Wie vorher gezeigt werden konnte, besitzen die einzelnen Stämme deutliche Spezialanpassungen an bestimmte Kohlenstoffquellen. Ebenso könnte man nach vorstehenden Beobachtungen und den gefundenen verschiedenen Eigenschaften der Stickstoffbindung der Stämme (Variationskurve der Anfangsintensität) auch eine rassenbildende Wirkung von gebundenem Stickstoff unter ökologischen Bedingungen annehmen. Bei einem Organismus wie *Azotobacter*, mit einer extremen Spezialanpassung in der Stickstoffaneignung, die sicher eine zentrale Stellung in dessen Stoffwechselmechanismus einnimmt und zweifellos aus einer langen und gerichteten Entwicklung zum Spezialistentum entstand, müßte damit ein fortdauernder eminenter Ansatzpunkt zu rassenbildenden Kräften gegeben sein.

Die vorher beschriebene Hemmung durch Kaliumnitrat ist insofern von besonderer Bedeutung, als im I. Teil dieser Arbeit gefunden wurde, daß sich 70 untersuchte Stämme kaum durch ihre maximale Stickstoffbindungsfähigkeit unterscheiden lassen, dagegen auffallend durch eine sehr verschiedene Anfangsintensität des Wachstums und damit der Stickstoffbindung. Diese Unterscheidbarkeit der natürlich vorkommenden Stämme liegt in der gleichen Richtung wie die vorher beschriebene durch Kaliumnitrat induzierte Hemmung bei Wachstum in künstlicher Kultur, welche Wirkung jedoch in vorliegenden Versuchen nicht andauerte. Es könnte deshalb angenommen werden, daß die Eigenschaft der verschiedenen Anfangsintensität der Stickstoffbindung bei den natürlichen Stämmen als eine durch die Vorkultur unter ökologischen Bedingungen in den verschiedenen Böden bedingte Dauermodifikation anzusehen ist, und zwar vor allem als eine Wirkung der darin vorhandenen Stickstoff-Wirkungspotentiale.

Wenn vorher die Meinung ausgesprochen wurde, daß sich womöglich auch direkte Zusammenhänge zwischen den Eigenschaften der Reinkulturen (d. h. gleichzeitig auch mit der charakteristischen Variationskurve der Eigenschaften) und dem ökologischen Herkunftsort der Stämme aufzeigen lassen müßten, so wäre nach den vorstehend aufgezeigten Ergebnissen bei zukünftigen Untersuchungen vor allem den Stickstoffverhältnissen in der „Vorkultur“, — in diesem Fall also dem Boden — besondere Aufmerksamkeit zu schenken.

Außerdem ist auf Grund der vorstehend mitgeteilten Ergebnisse zu fordern, daß bei allen Untersuchungen mit *Azotobacter* nicht nur die Kultur, sondern auch in gleichem Maße die Vorkultur berücksichtigt werden muß. Sicher lassen sich allein daraus bisherige Widersprüche in der Literatur erklären, zumal *Azotobacter* gerade oft auf Nährböden mit geringen Stickstoffmengen weitergezüchtet wurde.

III. Fragen der Kohlenstoffökonomie in Beziehung zum Stammproblem, zur Konzentration und dem Energiewert der Kohlenstoffquellen und zur Aktivierung durch Pyridin.

1. Der Verlauf der Kohlenstoffökonomie bei verschiedenen Stämmen.

Es erschien nun weiterhin von besonderem Interesse, die Ökonomie der Kohlenstoffverarbeitung, sowohl in ihrem zeitlichen Verlauf, als auch im Endergebnis, bei Stämmen mit verschiedenen Eigenschaften zu untersuchen.

Im 1. Versuch, Tabelle VI, wurden die Verhältnisse bei *Stamm G* in 50 cem Normalglykoselösung in 250er Fernbach-Kolben bei 30° C mit und ohne Agar untersucht, und zwar innerhalb eines Zeitraumes von 3 Stunden bis 12 Tagen Wachstum. In einer Parallele wurde der Stickstoff nach KJELDAHL bestimmt, in der zweiten Parallele der Zuckerverbrauch in einem Teil des Zentrifugates in je zwei Proben nach BERTRAND. In der restlichen Substratmenge (restliches Zentrifugat + Sediment = (Z) in Tabelle VI) wurde nochmals der Stickstoff nach KJELDAHL bestimmt.

Tabelle VI. Stickstoffbindung, zeitlicher Verlauf derselben mit und ohne Agar und Kohlenstoffökonomie bei Glykose als Kohlenstoffquelle für *Stamm G*.

Wachstum in Stunden oder Tagen	ohne Agar				mit Agar			
	N-Bindung in mg	Eiweiß	Zucker- verbr.	Eiweiß- koeff.	N-Bindung in mg	Eiweiß	Zucker- verbr.	Eiweiß- koeff.
3 Std.	0,0 0,0 (Z)	0	6	—	0,0 0,0 (Z)	0	17	0
6 Std.	0,0 0,0 (Z)	0	0	—	0,0 0,0 (Z)	0	42	0
12 Std.	0,0 0,0 (Z)	0	11	0	0,43 0,43 (Z)	2,70	42	6,43
1 Tag	0,43 0,29 (Z)	2,70	55	4,9	1,01 0,72 (Z)	6,30	72	8,75
2 Tage	7,49 8,65 (Z)	46,81	611	7,66	12,68 12,68 (Z)	79,25	969	8,18
4 Tage	12,68 10,66 (Z)	79,25	969	8,18	12,25 10,81 (Z)	76,56	969	7,91
6 Tage	12,68 11,38 (Z)	79,25	969	8,18	12,25 11,10 (Z)	76,56	969	7,91
8 Tage	12,68 11,82 (Z)	79,25	969	8,18	12,39 11,10 (Z)	77,44	969	7,99
10 Tage	12,68 11,82 (Z)	79,25	969	8,18	12,39 11,82 (Z)	77,44	969	7,99
12 Tage	12,54 11,82 (Z)	78,38	969	8,09	12,39 9,80 (Z)	77,44	969	7,99

Blindproben zu Tabelle VI: a) Stickstoffbestimmung: Nährlösung ohne Agar = 0,7205 im Mittel, Nährlösung mit Agar = 1,0087 im Mittel; b) Zuckerbestimmung: im Mittel aus 2 Parallelen: Nährlösung ohne Agar = 968,8 mg Glykose, Nährlösung mit Agar = 968,8 mg Glykose.

Die Stickstoffblindwerte wurden von allen Werten in der Tabelle vorher abgezogen. In der Tabelle wurden 969 mg Glykose als Vollgehalt der Nährlösung eingesetzt. Zur Berechnung des Eiweißkoeffizienten siehe im Text, ebenso betreffend „(Z)“.

Für die Berechnung des Eiweißkoeffizienten wurde jeweils die Stickstoffvollbestimmung der 1. Parallele berücksichtigt und der Zuckerverbrauch, wie er sich aus den beiden nach BERTRAND bestimmten Proben der 2. Parallele im Mittel ergab. Dadurch sind gewisse Schwankungen innerhalb der Parallelen nicht beachtet, die eine Fehlerquelle darstellen können (vgl. PELLEGRINI). Bei Vergleich der Stickstoffvollbestimmungen in Tabelle VI mit den Stickstoffbestimmungen in (Z) ergibt sich jedoch, daß dieser Fehler nicht bedeutend sein kann, indem letztere Werte zwar fast durchweg etwas niedriger liegen als die Vollbestimmungen, doch in einem sehr regelmäßigen Verhältnis, was auf die Vergleichsmöglichkeit der Ergebnisse ohne Einfluß bleibt.

In Nährlösung ohne Agar ist nach 3, 6 und 12 Stunden Wachstum noch kein Stickstoff zu finden, während bei 12 Stunden nur ein geringer Zuckerverbrauch festzustellen ist. Auch nach einem Tag ist die Stickstoffbindung noch minimal (0,43 mg) bei relativ hohem Zuckerverbrauch und entsprechend niedrigem Eiweißkoeffizienten (4,91). Die Stickstoffbindung steigt dann bei ökonomischer werdendem Zuckerverbrauch (steigender Eiweißkoeffizient) bis zum Maximum der Stickstoffbindung mit einem Eiweißkoeffizienten von 8,18 bei vollkommenem Verbrauch des Zuckers. Dieser Wert bleibt dann auch konstant bis zu 12 Tagen Wachstum; nach 12 Tagen geringer Abfall durch beginnende autolytische Vorgänge.

In Nährlösung mit Agar ist der Verlauf im Grundsatz ähnlich, nur mit der entsprechend deutlichen Agarwirkung. Auch hier ist nach 3 und 6 Stunden noch kein Stickstoff nachzuweisen²⁰, hingegen schon nach 3 Stunden ein deutlicher Zuckerverbrauch. Nach 12 Stunden und einem Tag ist der Stickstoffgewinn ebenfalls erst gering, jedoch bei günstiger liegenden Eiweißkoeffizienten als in Nährlösung ohne Agar. Nach zwei Tagen Wachstum ist in Nährlösung mit Agar bereits das Maximum der Stickstoffbindung mit dem gleichen Eiweißkoeffizienten (8,18) erreicht wie in Nährlösung ohne Agar.

Grundsätzlich besagen diese Ergebnisse, daß sowohl in Nährlösung ohne als auch mit Agar *Stamm G* eine Induktionszeit von etwa 1 Tag besitzt, in der bei noch fehlender bzw. geringer Stickstoffbindung bereits Zucker verbraucht bzw. bei niedrigem Eiweißkoeffizienten (unökonomisch) verarbeitet wird. Zwischen 12 Stunden und 1 Tag Wachstum setzt dann in beiden Fällen die Periode des großen Wachstums mit steigender Ökonomie der Zuckerverarbeitung ein, die jedoch in Nährlösung ohne Agar eine langsam ansteigende Kurve ergibt, die erst nach 4 Tagen den Maximalwert der Stickstoffbindung erreicht. In Nährlösung mit Agar ist die Periode des großen Wachstums dagegen auf die Zeit zwischen 12 Stunden und 1 Tag zusammengedrängt und erreicht bereits nach 2 Tagen den maximalen Eiweißkoeffizienten von 8,18. Die von RIPPEL (2) zuerst mitgeteilte Agarwirkung läßt sich in vorstehendem Versuche sehr schön als stoffwechselbeschleunigende Wirkung bei normaler Ökonomie zeigen, wobei erkannt wird, daß der Schwerpunkt der Wirkung in der Periode des großen Wachstums liegt.

Gleichzeitig mit *Stamm G* wurde auch *Stamm IB* geprüft, ein sehr charakteristischer Stamm mit geringer Anfangsintensität. Die Ergeb-

²⁰ Entsprechend dem Zuckerverbrauch müßten mit der angewandten Bestimmungsmethode bereits geringe Stickstoffmengen nachzuweisen sein.

nisse des Versuches sind in Tabelle VII zu finden. Zum Unterschied zu *Stamm G* ist für *Stamm IB* lediglich die Induktionszeit länger und der Anstieg in der Periode des großen Wachstums ist langsamer.

Tabelle VII. Wie in Tabelle VI, jedoch *Stamm IB*.

Wachstum in Stunden oder Tagen	ohne Agar				mit Agar			
	N-Bindung in mg	Eiweiß	Zucker- verbr.	Eiweiß- koeff.	N-Bindung in mg	Eiweiß	Zucker- verbr.	Eiweiß- koeff.
3 Std.	0,0 0,0 (Z)	0	0	—	0,0 0,0 (Z)	0	10	—
6 Std.	0,0 0,0 (Z)	0	0	—	0,0 0,0 (Z)	0	0	—
12 Std.	0,0 0,29 (Z)	(1,81)?	0	—	0,0 0,0 (Z)	0	32	0
1 Tag	0,0 0,0 (Z)	0	41	0	0,0 0,0 (Z)	0	53	0
2 Tage	0,43 0,58 (Z)	2,70	63	4,28	0,86 1,01 (Z)	5,38	116	4,63
4 Tage	3,46 4,03 (Z)	21,63	281	7,69	7,49 11,96 (Z)	46,81	617	7,58
6 Tage	8,36 5,62 (Z)	52,25	638	8,18	11,82 11,96 (Z)	73,88	923	8,00
12 Tage	10,38	64,87	851	7,61	12,10	75,63	969	7,81

Blindproben und Behandlung siehe unter Tabelle VI.

Im folgenden Versuch sollten diese Verhältnisse nun für weitere Stämme untersucht werden, die sich charakteristisch in ihrer Anfangsintensität unterscheiden. Den Stämmen *G*, *SO* und *Kol I* wurden 3 Stämme mit geringer Anfangsintensität gegenübergestellt (*IB*, *J₄*, und *IA*). Außerdem wurden ein Stamm von *A. vinelandii* (*KG₂*) mit hoher Intensität und ein Stamm von *A. Beijerinckii* (*K₇*) mit geringer Anfangsintensität geprüft. Analysen erfolgten nach 2, 4, 6 und 12 Tagen. Die Methodik war die gleiche wie im vorigen Versuch. Aus Raummangel und der Übersichtlichkeit wegen sind in Tabelle VIII nur die Stickstoffgewinne und die aus dem Zuckerverbrauch errechneten Eiweißkoeffizienten (in Klammern) zusammengestellt.

Für die 3 ersten Stämme mit hoher Anfangsintensität liegen die Verhältnisse wie in dem ausführlich besprochenen Versuche mit *Stamm G*. Nach 2 Tagen ist bereits die maximale Stickstoffbindung erreicht. Bei den Stämmen mit geringer Anfangsintensität (4.—6. u. 8.) sind die Stickstoffwerte nach 2 Tagen noch sehr niedrig. Die zugehörigen Eiweißkoeffizienten zeigen wieder deutlich (wie schon vorher bei *Stamm G* und *IB*, in Tab. VI u. VII) die ungünstige Ökonomie zu Beginn des Wachstums (Induktionsperiode und Beginn der großen Periode des Wachstums), während für 1.—3. in diesem Versuch nach 2 Tagen diese Periode bereits überschritten ist. Die Stämme mit geringer Anfangsintensität besitzen demnach eine längere Induktionszeit mit einer eben-

falls relativ unökonomischen Zuckerverarbeitung bis zum Beginn der Periode des großen Wachstums. Auch in der Periode des großen Wachstums ist der Anstieg für diese Stämme dann langsamer.

Tabelle VIII. *Verlauf der Stickstoffbindung und Kohlenstoffökonomie bei acht charakteristischen Stämmen.*

Stamm	Stickstoffbindung in mg, dazugehörige Eiweißkoeffizienten in Klammern nach:			
	2 Tagen	4 Tagen	6 Tagen	12 Tagen
1. <i>G</i>	12,39 (9,62)	11,67 (7,56)	11,53 (7,48)	10,59 (7,11)
2. <i>SO</i>	11,10 (12,12) ²¹	11,82 (7,67)	11,82 (7,67)	11,53 (7,48)
3. <i>Kol I</i>	9,80 (7,77)	11,24 (7,45)	12,68 (8,23)	12,10 (7,75)
4. <i>IB</i>	1,44 (4,92)	12,39 (8,04)	12,25 (7,95)	12,39 (8,04)
5. <i>J₄</i>	1,73 (5,34)	10,09 (9,00)	12,10 (7,90)	12,68 (8,03)
6. <i>IA</i>	1,44 (3,20)	8,93 (6,81)	11,53 (7,63)	12,10 (7,84)
7. <i>KG₂ (A. vin.)</i>	5,48 (7,06)	11,53 (8,84)	12,25 (7,95)	11,83 (7,68)
8. <i>K₇ (A. Beij.)</i>	1,15 (7,19) ²¹	3,75 (4,20)	12,68 (8,28)	12,25 (7,95)

Fassen wir zusammen, daß *Azotobacter* eine Induktionszeit durchmacht, in der bei fehlendem Stickstoffgewinn bereits Zucker verbraucht wird und anschließend bei minimalem Stickstoffgewinn eine relativ unökonomische Zuckerverarbeitung stattfindet. Die Induktionszeit ist für einen Stamm in Nährlösung ohne und mit Agar ungefähr gleich lang, die Agarwirkung ist also in der Hauptsache auf die der Induktionsperiode folgende Periode beschränkt. Für verschiedene Stämme ist die Induktionszeit jedoch verschieden lang. Auf die Induktionszeit folgt die Periode des großen Wachstums mit ansteigender Ökonomie der Kohlenstoffverarbeitung. Diese Periode ist bei verschiedenen Stämmen auf kürzeste Zeitspanne zusammengedrängt und erreicht den maximalen Wert bereits am 2. Tag, bei anderen ergibt sich ein langsamerer Anstieg. Stämme mit langer Induktionszeit haben auch eine langsamer ansteigende Kurve in der Periode des großen Wachstums. In beiden Fällen wird ein annähernd gleicher Maximalwert der Stickstoffbindung erreicht bei annähernd gleicher Ökonomie der Zuckerverarbeitung. (Eiweißkoeffizient um 8,0).

Daraus ist zu folgern, daß sowohl eine bestimmte Energiemenge für die Induktionsperiode als auch für die Periode des großen Wachstums festliegt. Einzelne Stämme kennzeichnen sich durch langsamere oder schnellere Verarbeitung der für die beiden Entwicklungsperioden zur

²¹ Zu hoch. Fehler in der Zuckerbestimmung. Wiederholungen ergaben für Stamm *SO* Werte um 8 und für Stamm *K₇* zwischen 3—4.

Verfügung stehenden Energiemengen, wobei die im zeitlichen Verlauf unterschiedliche Verarbeitung im Endergebnis aber gleich ökonomisch geschieht. Dies ist ein überraschendes Ergebnis. Was hier vorliegt, kann an dieser Stelle noch nicht gesagt werden, doch wird weiter unten noch darauf zurückgekommen.

Diese Feststellungen widersprechen Angaben von KOCH und SEYDEL, die fanden, daß in den ersten Tagen der Kultur bei relativ geringen Mengen verarbeiteter Glykose je g die Stickstoffbindung bedeutend höher war (bis zu 70 mg N/g Glykose): als im weiteren Verlauf der Entwicklung (vergl. jedoch KRISHNA).

2. Versuche mit verdünnter Kohlenstoffquelle.

Die letzte Frage wurde auch von anderem Gesichtspunkt aus betrachtet, indem geprüft wurde, ob verschiedene Konzentrationen von Glykose unterschiedlich ökonomisch verarbeitet werden, ob also z. B. bei Angebot sehr geringer Glykosekonzentration eine größere Menge Stickstoff je g Glykose gebunden wird.

Vergleiche hierzu auch die Darstellung bei WAKSMAN nach Ergebnissen anderer Untersucher, nach der die je 1 g Energiequelle gebundene Menge an Stickstoff bei Konzentrationserniedrigung ebenfalls steigen soll; doch liegen die dort gefundenen Werte je 1 g Mannit (Konzentrationen zwischen 0,1—1,5%) im Vergleich zu den in vorliegender Arbeit gefundenen Werten äußerst niedrig und dementsprechend können die Ergebnisse durch unteroptimale Kulturbedingungen verursacht sein. — Diese Frage ist auch im Zusammenhang mit dem Rhizosphärenproblem (vergl. STARC, dort auch weitere Literatur) und der Samenimpfung mit *Azotobacter* von Bedeutung, indem angenommen wurde, daß *Azotobacter* von durch die Wurzeln ausgeschiedenen geringen Mengen von Kohlenstoffquellen leben könne.

Die Ergebnisse von 3 Versuchsserien sind in Tabelle IX, A, B, C zusammengestellt. Aus Raummangel und der Übersichtlichkeit wegen sind nur die aus 6—7 Parallelen gefundenen Mittelwerte der Stickstoffbindung je 1 g Glykose mit Angabe des mittleren Fehlers (Fm) aufgeführt.

In den Versuchen wurde entweder die Normallösung mit 2% Glykose stufenweise verdünnt bis zu einer Glykosekonzentration von 0,025% (Versuch A I) oder die Nährsalzkonzentration blieb unverändert und nur die Glykosekonzentration wurde stufenweise verdünnt. Die Kultur erfolgte in 10 ccm Nährlösung direkt in den Aufschlußkölbchen für die Halbmikro-Kjeldahlbestimmung, um Umfüllverluste zu vermeiden. Um durch Schwankungen bedingte Fehler auszuschalten, wurde mit 6—7 Parallelen für jede Konzentration gearbeitet. Die Impfung erfolgte mit Platinnadel von 2 Tage alter Normalagar-Kultur, Wachstum 12 Tage bei 30° C. Kontrollen zeigten, daß dann die Glykose restlos verbraucht war, also maximale Ausnutzung angenommen werden konnte.

Die Kulturen wurden zuerst mikroskopisch beurteilt, z. T. auch der Versuch gemacht, an Hand der Zellenzahl die Ökonomie zu bestimmen, was jedoch schwierig ist, da die Zellen zusammenballen. Die Grenze der angewandten Halbmikro-KJELDAHL-Bestimmung wurde vorher genau kontrolliert. Bei stärkeren Verdünnungen als 0,05% Glykose war in den Kulturen ein Stickstoffgewinn eindeutig nicht mehr nachzuweisen.

Sowohl in Nährlösung, in der alle Komponenten gemeinsam stufenweise verdünnt waren (Tabelle IX, Versuch A), als auch in Nährlösung, in der nur die Glykosekonzentrationen stufenweise herabgesetzt waren, bei gleichbleibender Normalkonzentration der übrigen Komponenten (Tabelle IX, Versuche B und C), ergab sich ein ziemlich gleichmäßiger Abfall des je 1 g Glykose gebundenen Stickstoffs mit abnehmender Glykosekonzentration. Dabei ist deutlich, daß in allen 3 Versuchsserien der Beginn des Abfalls scharf bei Konzentrationen zwischen 0,5 und

Tabelle IX. Zusammenstellung der in vier Versuchsserien gefundenen Mittelwerte der Stickstoffbindung je 1 g Glykose bei fallenden Konzentrationen der Kohlenstoffquelle.

n = Zahl der Parallelen, M = Mittelwert der Stickstoffbindung in mg je 1 g Glykose,

$$F_m = \sqrt{\frac{\sum (f^2)}{n(n-1)}} = \text{mittlerer Fehler.}$$

Konz. der C-Quelle in v. H.	Versuch A			Versuch B			Versuch C			Versuch D		
	n	M	F _m	n	M	F _m	n	M	F _m	n	M	F _m
2,0	6	11,09 ± 0,35		6	11,33 ± 0,31		nicht bestimmt			1	10,59	—
1,0	6	11,16 ± 0,49		6	11,10 ± 0,49		7	11,26 ± 0,29		2	10,66 ± 0,28	
0,5	6	11,15 ± 0,83		6	12,07 ± 0,75		6	10,28 ± 0,62		3	11,13 ± 0,16	
0,25	6	8,00 ± 0,40		6	10,03 ± 0,50		7	9,72 ± 0,12		1	9,68	—
0,1	6	5,20 ± 1,49		6	5,19 ± 0,79		7	4,24 ± 0,59		2	6,70 ± 0,70	
0,05	6	0 —		6	0 —		7	1,19 ± 0,51		2	1,72 ± 0,11	
0,025	nicht bestimmt			nicht bestimmt			7	0 —		1	0,12	—

Entsprechende Blindproben (ebenfalls Mittelwerte aus 6—7 Parallelen) wurden von den einzelnen Parallelen vor Errechnung des Mittelwertes abgezogen.

In Versuch A Normallösung insgesamt stufenweise verdünnt. In Versuch B, C und D nur Glykose stufenweise verdünnt, übrige Salzkonzentration normal.

0,25% Glykose liegt. Die optimale Konzentration scheint zwischen 0,5 und 1,0% zu liegen. Jedoch sind die Werte auch bei 2% Glykose auf ungefähr gleicher Höhe.

Zu beachten ist noch, daß sich besonders bei den stärkeren Verdünnungen innerhalb der Parallelen bedeutende prozentuale Schwankungen zeigen, was (abgesehen von der Grenzsicherheit der Bestimmungsmethode) ebenfalls ein Zeichen für ungünstiger werdende Lebensbedingungen sein könnte. Mikroskopische Beurteilungen schienen dies zu bestätigen. Andererseits erscheinen die Ergebnisse als Mittelwerte aus 6—7 Parallelen bis zur Glykosekonzentration von 0,1% genügend gesichert. Trotzdem wurde versucht, die vorher gewonnenen Ergebnisse noch auf anderem Wege nachzuprüfen:

Dazu wurden Kulturen mit je 1000 ccm Nährlösung entsprechender Verdünnungen angesetzt in je 2 großen Fernbach-Kulturschalen aus Jenaer 20er

Glas von 35 cm Bodendurchmesser, die jeweils mit 2 verschiedenen Glykoseverdünnungen beschickt (Salze normale Konzentration), mit *Stamm G* beimpft und 12 Tage wachselassen wurden. Vor der Stickstoffanalyse wurden die Kulturen zur gleichmäßigen Verteilung der Bakteriensubstanz mit Schwefelsäure angesäuert und leicht aufgeköcht. Von den Kulturen mit 2—0,25 % Glykose wurde in je zweimal 50 ccm der Stickstoff bestimmt; entsprechende Blindbestimmungen wurden natürlich abgezogen. Die Kulturen mit stärkeren Verdünnungen wurden folgendermaßen verarbeitet:

Nach Ansäuern und Aufkochen im Standzylinder mit Wasser auf 1000 aufgefüllt. Nach guter Durchmischung Stickstoffbestimmung in a) 50 ccm davon, b) den übrigen 950 ccm nach Abdestillation des größten Teiles des Wassers. Ein entsprechender Blindwert wurde abgezogen. Nach Umrechnung auf je 1 g Glykose gebundenen Stickstoff wurden die Mittelwerte aus a und b errechnet. Die Ansätze wurden für bestimmte Konzentrationen bis zu 3 mal wiederholt. Siehe dazu unter n in Tabelle IX, Versuch D. Dort sind wie auch in den vorigen Versuchen vergleichbar die Mittelwerte mit mittlerem Fehler zu finden.

Es fanden sich bei diesen Versuchen (Tabelle IX, D) also keine Hinweise dafür, daß schwächere Konzentrationen an Glykose ökonomischer verarbeitet werden als höhere, vielmehr war ein deutlich beginnender Abfall zwischen Konzentrationen von 0,5 und 0,25%, während anscheinend bei ungefähr 0,5% die Optimalkonzentration liegt. Höhere Konzentrationen als 2% wurden jedoch quantitativ nicht geprüft.

Ein ähnliches Ergebnis hatte auch die Prüfung von Natriumbenzoat, indem gezeigt werden konnte, daß Konzentrationen von 2% kaum verarbeitet werden, eine Konzentration von 0,5% jedoch von allen Stämmen gut (siehe folgenden Abschnitt).

3. Die Bedeutung des Energiewertes der Kohlenstoffquellen für die maximale Stickstoffbindung.

In Vorversuchen hatte sich ergeben, daß der maximale Stickstoffbindungswert für *Stamm G* (entsprechend auch für die anderen Stämme) bei 1 g Mannit um 18 mg N, bei Glykose um 13,0 mg gebundenem Stickstoff lag. Es war zu fragen, worauf diese Erscheinung beruht.

Auch KOSTYSCHEW, RYSKALTSCHUK und SCHWEZOWA fanden bei zahlreichen Stickstoffausbeuten, daß diese in Mannitlösung größer sind als in Zuckerlösung (nach 9 Tagen: Mannit = 20,0 mg, Zucker = 14,1 mg je 100 ccm Nährlösung mit 2 % der Kohlenstoffquelle). Zu den Angaben MCKERIDGES, der ein konstantes Verhältnis zwischen der Stickstoffbindung und der Verbrennungswärme von Buttersäure und Ameisensäure fand, weist WAKSMAN darauf hin, daß der Stickstoffgewinn sowohl vom Energiewert der Kohlenstoffquelle wie auch vom Grad der Verarbeitung abhängig ist. Jedoch haben STAPP und RUSCHMANN schon bemerkt, daß *Azotobacter* verschiedenen Kohlenstoffquellen gegenüber, die sich nur sehr gering in ihrer chemischen Konstitution unterscheiden, ein sehr feines Auswahlvermögen besitzt. Das konnte auch für die verschiedenen Stämme in vorliegender Arbeit bestätigt werden.

Man hätte die Ursachen der unterschiedlichen maximalen Stickstoffbindung bei Mannit und Glykose womöglich im Energiegehalt der beiden Stoffe vermuten können. Die Verbrennungswärme der Glykose

beträgt 3743 cal/g, für Mannit 3998 cal/g. Die beiden Kohlenstoffquellen verhalten sich also in ihren Energiewerten wie 100 : 106,8, während sich die Stickstoffbindungswerte bei Annahme von 13 mg für Glykose und 17,5 mg für Mannit (Mittel von den 68 in Abb. V dargestellten Stämmen genau: 17,76 mg) wie 100 : 134,6 verhalten. Wie die Versuche über die Kohlenstoffökonomie zeigten, ist bei solchem Maximalwert die Glykose restlos verbraucht. Wäre das nicht der Fall, so würde das Verhältnis für Mannit noch günstiger liegen. Man sieht, der Unterschied in der maximalen Stickstoffbindung läßt sich nicht durch den verschiedenen Energiewert erklären. Darum mußte versucht werden, weitere Kohlenstoffquellen zu finden, die 1. gut von *Azotobacter* verarbeitet werden, 2. einen sehr abweichenden Energiewert besitzen.

Oxalsäure schien vom Standpunkt des Energiewertes sehr geeignet. Die Prüfung zeigte jedoch, daß diese von keinem der vorhandenen *Azotobacter*-Stämme verarbeitet wird und sich auch beim Versuch, womöglich einen Stamm mit entsprechender Anpassung direkt auf Oxalsäure aus dem Boden zu isolieren, kein Erfolg zeigte.

Nachdem WINOGRADSKY (3) zuerst zeigte, daß Benzoesäure gut von *Azotobacter* verarbeitet wird und die eigenen Prüfungen das gleiche ergaben, jedoch mit gewissen Einschränkungen hinsichtlich der Konzentration (2% praktisch keine Verarbeitung, bei 1% innerhalb der Parallelen bedeutende Schwankungen, 0,5% gute Verarbeitung), konnte diese Kohlenstoffquelle mit ihrem im Vergleich zu Glykose und Mannit extrem hohen Energiewert (Benzoesäure: 6324 cal/g Verhältnis zum Energiewert der Glykose 169 : 100) zum Versuch herangezogen werden.

Das Natriumbenzoat wurde als Benzoesäure bestimmt: Ansäuern der Lösung mit Schwefelsäure, Ätherauszug (mehrfach), n/10 NaOH vorgelegt (Phenolphthalein als Indikator), Äther abdestilliert, heiß gegen n/10 Schwefelsäure zurücktitriert. Der Titrierwert der verwendeten etwa n/10 Lauge wurde in mehreren Proben vorher gegen Benzoesäure bestimmt und das Mittel daraus zugrunde gelegt. 1 ccm Lauge entsprachen 12,276 mg Benzoesäure. Zur Überprüfung der Eignung der benutzten Methode zur Bestimmung von Natriumbenzoat als Benzoesäure (1 g Natriumbenzoat $\text{NaC}_7\text{H}_5\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}$ entsprechen 0,7531 g Benzoesäure) wurden eine Anzahl Kontrollbestimmungen gemacht in 0,5, 1 und 2%iger Lösung, und es ergab sich ebenso wie auch bei den nachfolgend bei den Versuchen aufgeführten Blindbestimmungen, daß der Fehler innerhalb der 10 mg-Grenze lag.

Im 1. Versuch (Tabelle X) wurde mit 1%iger Nährlösung ohne Agar gearbeitet. Die Schwierigkeit bestand darin, das schwankende Wachstum der Parallelen bei 1%iger Konzentration zu umgehen (siehe vorher). Es kam darauf an, die maximale Stickstoffbindung je 1 g Natriumbenzoat zu ermitteln, um so ein Bild von der Kohlenstoffökonomie mit Natriumbenzoat bei vollkommenem Verbrauch desselben zu bekommen.

Zur Bestimmung der Stickstoffbindung und des Natriumbenzoatverbrauches wurden 18 Kolben (die doppelte Anzahl der zur Analyse nötigen) angesetzt. Nach 6 Tagen war das Wachstum sehr unterschiedlich weit fortgeschritten und 3 Kolben zeigten überhaupt kein Wachstum. Nach 12 Tagen waren die meisten Kolben tiefbraun und gut bewachsen. Zur Analyse wurden

9 Kolben ausgewählt, und zwar die im Wachstum am gleichmäßigsten weit vorgeschrittenen Kulturen (mikroskopische Prüfung und Färbung der Nährlösung). Die übrigen Kulturen wurden ausgeschieden. Es wurden bestimmt: 1. In je 3 Kulturen der Stickstoff nach KJELDAHL. 2. je 3 Kulturen wurden zentrifugiert und darin a) der Stickstoff im Sediment, b) der Stickstoff im Zentrifugat bestimmt. 3. je 3 Kulturen wurden zentrifugiert und darin a) der Stickstoff im Sediment, b) die Benzoesäure im Zentrifugat bestimmt. Außerdem wurden 2 Blindproben auf Stickstoff und 3 Blindproben auf Natriumbenzoat ausgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle X zu finden.

Tabelle X.

Stickstoffbindung und Natriumbenzoat-Verbrauch in 1 prozentiger Nährlösung.

	Stickstoffbestimmungen in mg		Benzoessäurebestimmung in mg		
Analysen	Sediment — Zentrifugat	Blindwert abgezogen			
1. Parallele: (3 Kulturen)					
1. Sediment — Zentrifugat	7,78	7,06	weniger als 5 mg		
2. a) Sediment	3,03	7,64			6,92
b) Zentrifugat	4,61				
3. a) Sediment	2,88				
b) Benzoessäure					
2. Parallele: 3 Kulturen					
1. Sediment — Zentrifugat	8,07	7,35	alles verbraucht		
2. a) Sediment	4,61	6,92			6,20
b) Zentrifugat	2,30				
3. a) Sediment	6,20				
b) Benzoessäure					
3. Parallele: 3 Kulturen					
1. Sediment — Zentrifugat	7,06	6,34	alles verbraucht		
2. a) Sediment	5,62	7,49			6,77
b) Zentrifugat	1,87				
3. a) Sediment	3,31				
b) Benzoessäure					

Blindproben auf Stickstoff: 0,72/0,72, im Mittel 0,72.

Blindproben auf Natriumbenzoat: 50 cem Nährlösung ohne Agar mit 0,5 g Natriumbenzoat entsprechen 0,375 g Benzoesäure. Zurückbestimmt: 372/360/272, im Mittel 368 mg Benzoesäure.

Um zu prüfen, ob auch noch kleine Mengen Natriumbenzoat durch die Analyse erfaßt werden, wurden 20 mg Natriumbenzoat in 20 cem Nährlösung eingewogen und dann bestimmt: 20 mg Na-benzoat entsprechen 15,06 mg Benzoesäure. Zurückbestimmt wurden 12,276 und 9,821 mg Benzoesäure. (Geringer Verlust beim Ätherauszug!)

Im 2. Versuch (Tabelle XI) wurde mit 50 ccm 0,5%iger Nährlösung gearbeitet. Vorproben hatten ergeben, daß bei dieser Konzentration das Wachstum einigermaßen gleichmäßig ist, auch bei weniger als 12 Tagen Wachstum. In diesem Versuchsansatz sollte neben der maximalen Stickstoffbindung auch der Stickstoffgewinn und die Kohlenstoffökonomie nach 3 und 6 Tagen Wachstum bestimmt werden. Nach 3 und 6 Tagen Wachstum wurden wie im vorigen Versuch je 3 Kulturen, nach 12 Tagen 2 mal 3 Kulturen analysiert.

In beiden Versuchen wurde von einer 2 Tage alten Normalagar-Kultur von *Stamm G* geimpft.

Im Versuch mit 1-prozentiger Nährlösung (0,5 g Natriumbenzoat in 50 ccm) beträgt im Mittel aus 6 Analysenwerten der Stickstoffgewinn 6,77 mg bei restlos verbrauchter Kohlenstoffquelle, also je 1 g Natriumbenzoat 13,54 mg N. Der Stickstoffgewinn im Versuche mit 0,5-pro-

Tabelle XI. *Stickstoffbindung und Natriumbenzoat-Verbrauch in 0,5 prozentiger Nährlösung nach 3, 6 und 12 Tagen Wachstum.*

Analysen in:	Stickstoff in mg	
	Sediment — Zentrifugat	Blindwert abgezogen
3 Tage Wachstum		
1. Sediment — Zentrifugat	1,15	0,43
2. a) Sediment	0,86 } 1,44	0,72
b) Zentrifugat		
3. a) Sediment	0,72	
b) Benzoessäurebestimmung: Noch 189,08 mg Na-benzoat vorhanden		
Demnach Na-benzoat verbraucht: 60,92 mg		
Eiweiß gebildet 3,60 mg		
Eiweißkoeffizient 5,90		
6 Tage Wachstum		
1. Sediment — Zentrifugat	3,60	2,88
2. a) Sediment	2,59 } 3,46	2,59
b) Zentrifugat		
3. a) Sediment	2,31	
b) Benzoessäurebestimmung: Noch 30,98 mg Na-benzoat vorhanden		
Demnach Na-benzoat verbraucht: 219,02 mg		
Eiweiß gebildet 18,01 mg		
Eiweißkoeffizient 8,22		
12 Tage Wachstum (I)		
1. Sediment — Zentrifugat	4,03	3,31
2. a) Sediment	2,31 } 4,18	3,46
b) Zentrifugat		
3. a) Sediment	2,59	
b) Benzoessäurebestimmung: Weniger als 5 mg Na-benzoat vorhanden		

Tabelle XI. (Fortsetzung.)

Analysen in:	Stickstoff in mg	
	Sediment — Zentrifugat	Blindwert abgezogen
12 Tage Wachstum (II)		
1. Sediment — Zentrifugat	3,89	3,17
2. a) Sediment	2,74)	3,31
b) Zentrifugat	1,87)	
3. a) Sediment	2,16	

b) Benzoessäurebestimmung: Kein Na-benzoat mehr vorhanden

Mittel aus 4 Stickstoffbestimmungen: 3,32 mg je 0,25 g Na-benzoat
(= 13,28 mg N/1 g Na-benzoat).

Eiweiß gebildet: 20,74 mg

Eiweißkoeffizient: 8,29

Blindproben auf Stickstoff: 0,72/0,72, Mittel 0,72 mg N.

Blindproben auf Na-benzoat: 0,25 g Na-benzoat entspricht 0,1875 g

Benzoessäure. Zurückbestimmt: 185,0/181,6/179,4 mg, im Mittel 182,0 mg Benzoessäure.

zentiger Nährlösung (0,25 g Natriumbenzoat in 5 ccm) beträgt nach 12 Tagen im Mittel aus 4 Analysenwerten (Tabelle XII) 3,32 mg bei restlos verbrauchter Kohlenstoffquelle, mithin je 1 g verbrauchten Natriumbenzoates 13,28 mg N.

Diese Ergebnisse zeigen einen Wert von rund 13 mg N/1 g Natriumbenzoat, vorausgesetzt, daß man die Unregelmäßigkeiten im Wachstum bei der weniger geeigneten hohen Konzentration von 1 % durch Auswahl von gleichmäßig voll ausgewachsenen Kulturen aus einer größeren Anzahl zur Analyse umgeht. Rechnet man mit 13 mg Stickstoff gebunden je 1 g Natriumbenzoat, so beträgt der Eiweißkoeffizient 8,22, liegt also im Endergebnis und während des Wachstumsverlaufes (siehe hierzu die Eiweißkoeffizienten nach 3, 6 und 12-Tagen Wachstum in Tabelle XI, verglichen mit denen von Glykose in Tabelle VI) auf der gleichen Höhe wie bei der Verarbeitung von Glykose.

Sehr auffallend ist bei diesen Versuchen, daß sich in den Kulturen mit Na-benzoat ein relativ hoher Anteil des Stickstoffs im Zentrifugat findet, im Gegensatz zu ähnlichen Kulturen mit Mannit und Glykose. Es liegt die Vermutung nahe, daß dies in einem gewissen Zusammenhang mit der Farbstoffbildung in diesen Kulturen steht. Die starke tiefschwarze Verfärbung (Zwischentöne beim Erscheinen: grünlich-rötlich-braun) ist nämlich äußerst charakteristisch für die Kulturen mit Na-benzoat, wobei der Farbstoff in das Nährmedium diffundiert im Gegensatz zum normalen zellgebundenen Farbstoff von *A. chroococcum* bei Wachstum auf Mannit oder Glykose. Nachdem bereits RIPPEN und LUDWIG die Möglichkeit von Beziehungen der Farbstoffbildung von *A. chroococcum* zum Tyrosin und Melanin besprachen, ergibt sich aus vorstehender Beobachtung womöglich ein weiterer Hinweis zu ringförmigen Verbindungen, bzw. zu einem heterozyklischen Einbau des Stick-

stoffes. Auch *A. agilis* mit stark diffundierendem grünen Farbstoff zeigt bedeutende Stickstoffmengen in den Kulturfiltraten (MÖLER).

Die vorigen Ergebnisse bestätigen die Eignung von Natriumbenzoat als Kohlenstoffquelle für *Azotobacter*, wie sie von WINOGRADSKY angegeben wurde, vorausgesetzt, daß man eine geeignete Konzentration wählt. Hinsichtlich unserer eigentlichen Fragestellung war das Ergebnis allerdings negativ: Die bedeutend höhere Verbrennungswärme des Natriumbenzoates bewirkt je 1 g keine höhere Stickstoffbindung gegenüber Mannit oder Glykose.

In Tabelle XII ist nochmals die Ökonomie der Eiweißbildung mit Mannit, Glykose und Natriumbenzoat zusammengestellt.

Tabelle XII. Zusammenstellung der Ökonomie der Eiweißbildung mit Mannit, Glykose und Na-benzoat als Kohlenstoffquellen.

(Mittelwerte zugrunde gelegt, wie sie sich aus Analysen dieser Arbeit ergeben.)

Kohlenstoffquelle	Verbrennungswärme	N-Bindung in mg je 1g C-Quelle	Eiweiß in mg	Eiweißkoeff. bezogen auf % C-Gehalt ²²	Eiweißkoeff.
Mannit	3998 cal/g	17,5	109,37	10,94	14,38
Glykose	3743 cal/g	13,0	81,25	8,12	10,56
Na-benzoat	6324 cal/g ²³	13,0	81,25	8,12	9,51

Außerdem können durch die bestimmte Trockensubstanz indirekt auch Glycerin und Äthylalkohol verglichen werden. Als Mittelwert für 1 g Glykose ergab sich etwa 0,12 g Trockensubstanz. Für die *Stämme* KG₂ und IB, die Glycerin verarbeiten, ergab sich als Mittelwert 0,11 g, für Äthylalkohol etwa 0,09 g. Glycerin hat einen Energiewert von 4317 cal/g, Äthylalkohol von 7140 cal/g. Auch bei Berücksichtigung dieser Kohlenstoffquellen ergeben sich keine anderen Gesichtspunkte als vorher.

4. Versuche mit Pyridin und *Azotobacter*-Kochsaft.

Es war nun noch zu fragen, inwieweit der größere Gehalt an Wasserstoff im Mannit (2 H-Atome mehr gegenüber Glykose) für die günstige Wirkung dieses Alkohols verantwortlich ist.

Diese Frage scheint nicht unberechtigt, da R. NILSSON die Bedeutung und das Vorkommen von Co-Zymase in auf Glykose gezüchtetem *Azotobacter* zeigte. Er nimmt auf Grund von Beobachtungen auch gegenüber Mannit an: „... die Aufgabe der Co-Zymase und des entsprechenden Fermentsystemes scheint demnach in *Azotobacter* nicht ausschließlich darauf beschränkt zu sein, die Glykose und deren Abbauprodukte zu verarbeiten. Es ist nicht unwahrscheinlich, daß die Co-Zymase im Stoffwechsel der Zelle eine so allgemeine Funktion hat, daß sie im Bakterienkörper immer bei Züchtung auf den verschiedensten Substraten synthetisiert werden muß.“

²² Siehe RITTEL und NABEL. Die verschiedenen Kohlenstoffquellen enthalten ungleiche Mengen an Kohlenstoff. Diese Verhältnisse müssen zum Kohlenstoffgehalt des Eiweißes in Beziehung gesetzt werden, um eine tatsächliche Vergleichsmöglichkeit zu erhalten. Mannit enthält 39,56, Glykose 40,0, Na-benzoat 44,4 und Eiweiß 52,0 % Kohlenstoff.

²³ Es wurde der Wert für Benzoesäure eingesetzt. Der genaue Wert für Na-benzoat stand nicht zur Verfügung; er muß etwas geringer sein, was aber auf die obigen Vergleichsmöglichkeiten ohne Einfluß bleibt.

RIPEL-BALDES, STARC und KÖHLER andererseits fanden, daß geringe Mengen von Pyridin, das von *Azotobacter* nicht als Stickstoffquelle benutzt wird, eine auffallende fördernde Wirkung auf das Wachstum dieses Mikroben in den ersten Tagen zeigen. Es wurde von diesen Untersuchern die Meinung ausgesprochen, daß dies durch Wasserstoffübertragung wirken könne, zumal diese Wirkung auf Grund der Rolle des Pyridinkernes in der Co-Zymase durchaus möglich erscheint.

Man vergleiche weiter dazu auch die von WINOGRADSKY (7) angenommene „Azohydrase“, die unter Dehydrierung des Substrates und Bindung des aktivierten Wasserstoffes an freien Stickstoff die Ammoniaksynthese katalysieren soll. RABOTNOWA fand, daß der Bindungsprozeß von atmosphärischem Stickstoff das Oxydations-Reduktionspotential beeinflusst. Vergleiche weiter: KUBO, auch BACH und Mitarbeiter, deren Angaben jedoch von ROBERG nicht bestätigt werden konnten, weiter Co-Enzym R von ALLISON (zit. nach NILSSON).

Die Frage der Pyridinwirkung sollte noch einmal unter Berücksichtigung von Stämmen, die sich im normalen Verlauf ihrer Stickstoffbindung deutlich unterscheiden, geprüft werden. Man könnte auf Grund der vorher erwähnten Vorstellungen über die Pyridinwirkung annehmen, daß unter Umständen die geringe normale Anfangsintensität von Stamm *IB* im Gegensatz zu Stamm *G* durch die Pyridinwirkung ausgeglichen werden könnte, da diesem Stamm mit geringerer Anfangsintensität der Stickstoffbindung womöglich ein die Wasserstoffübertragung aktivierender Faktor mangle. Dafür könnte auch eine vorher bei den Versuchen über die Kohlenstoffökonomie gemachte Beobachtung sprechen, daß bei Stämmen sowohl mit geringer als auch großer Anfangsintensität der Stickstoffbindung und entsprechender Kohlenstoffverarbeitung im Endergebnis der Eiweißkoeffizient annähernd der gleiche ist, also der schnellere Stickstoffansatz nicht etwa durch einen größeren Energieverlust erkauft wird. Man könnte annehmen, daß diese auffallende Erscheinung durch ein katalysierendes System verursacht ist, das dem Stamm mit der geringen Anfangsintensität fehlt.

In Tabelle XIII sind die Ergebnisse eines Versuches mitgeteilt, in dem die Stämme *G* und *IB* in Normallösung mit 0,1% Agar, ohne CaCO_3 , ohne und mit Pyridin nach 2, 4, 6, und 12 Tagen geprüft wurden. Die Bestimmung des Eiweißstickstoffes erfolgte mit der Kupferfällungsmethode nach BARNSTEIN.

Nach 2 Tagen zeigt Stamm *G*, der Stamm mit der größten Anfangsintensität, eine deutliche, nach 4 Tagen nur noch eine geringe Förderung in den Kulturen mit Pyridin; nach 6 Tagen stehen die Ergebnisse von ohne und mit Pyridin gleich. Nach 12 Tagen ist ein früher beginnender deutlicher Abfall der Kulturen mit Pyridin sichtbar. Diese Ergebnisse bestätigen vollkommen die Angaben von RIPEL-BALDES, STARC und KÖHLER.

Stamm *IB* jedoch, mit geringer Anfangsintensität, reagierte ganz anders. Nach 2 Tagen Wachstum erscheint zwar im Mittelwert eine sehr geringe Förderung der Kulturen mit Pyridin. Betrachtet man jedoch die 4 Parallelen, so wird klar, daß dieses Ergebnis nicht eindeutig ist. Nach 4, 6 und 12 Tagen sind die Kulturen mit Pyridin deutlich im Nachteil gegenüber den Kulturen ohne Pyridin und selbst nach

Tabelle XIII. Versuch mit Pyridin: 0,05 ccm/100 ccm Nährlösung, Prüfung von Stamm G und IB.

Wachstum in Tagen	Eiweißstickstoff in mg							
	Stamm G				Stamm IB			
	ohne Pyridin		mit Pyridin		ohne Pyridin		mit Pyridin	
2	4,04		5,33		1,73		1,73	
	3,89	3,96	6,63	5,89	1,30	1,52	1,66	1,69
4	8,36		8,21		11,10		6,77	
	7,64	8,00	9,22	8,72	6,77	8,94	5,62	6,19
6	10,95		10,23		10,38		5,76	
	10,66	10,81	11,67	10,95	9,65	10,01	5,91	5,84
12	10,95		9,80		11,67		8,93	
	11,10	11,02	9,94	9,87	11,10	11,39	9,65	9,29

Nährlösung: Glykose 2 %, K_2HPO_4 0,1 %, $MgSO_4$ 0,05 %, $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$ 0,01 %, $Na_2MoO_4 \cdot 2 H_2O$ 0,5 mg/%, Agar 0,1 %.

Blindproben: Eiweißstickstoff in Nährlösung ohne Pyridin 0,72/0,72, mit Pyridin 0,72/0,72 = im Mittel 0,72 mg, von den Werten in der Tabelle abgezogen.

Eine Gesamtstickstoffbestimmung für Stamm G nach 12 Tagen Wachstum betrug: Nährlösung ohne Pyridin: 10,66/11,67, im Mittel 11,17 mg N. Nährlösung mit Pyridin: 11,38/12,54, im Mittel 11,96 mg N.

12 Tagen ist noch nicht der Maximalwert des Eiweißansatzes erreicht. Demnach wurde Stamm IB entweder überhaupt nicht durch Pyridin gefördert, oder aber das Optimum der Pyridinwirkung lag bei diesem Stamm bei einer anderen Pyridinkonzentration.

In weiteren Versuchen wurde darum das Verhalten von Stamm IB gegenüber verschiedenen Pyridinkonzentrationen geprüft, dabei auch geringere Mengen wie 0,01 und 0,005 ccm je 100 ccm Nährlösung. Auch hier zeigte sich keine Wirkung des Pyridins. Die Ergebnisse sind hier nicht besonders aufgeführt, in weiterem Zusammenhang ergibt sich das gleiche nochmals.

Auf ein Ergebnis der Tabelle XIII muß noch hingewiesen werden. Stamm G zeigte in diesem Versuch nicht die charakteristische Wachstumskurve. Sonst erreicht dieser Stamm nach 2 Tagen fast das Maximum der Stickstoffbindung in Nährlösung mit 0,1 % Agar. Es wurde vermutet, daß das Fehlen von Calciumcarbonat in der Nährlösung dafür verantwortlich sei. In den Versuchen von RIPPPEL, STARC und KÖHLER ist dieses weggelassen, weil die Agargabe angeblich die $CaCO_3$ -Wirkung ersetzt (bzw. Ca-Wirkung?). Um näheren Aufschluß darüber zu bekommen, wurde ein entsprechender Versuch eingeschoben. (Tabelle XIV).

Wir sehen also, daß in Nährlösung mit und ohne $CaCO_3$ der erreichte Maximalwert nach genügend langer Kulturdauer praktisch gleich ist. Bei 2 und 4 Tagen finden wir jedoch eine bedeutende Begünstigung der Kulturen in Normallösung mit Agar und mit $CaCO_3$. Mit Mannit als Energiequelle ist die $CaCO_3$ -Wirkung in den ersten Tagen des Wachstums noch

weit ausgeprägter, und selbst nach 12 Tagen hat die Kultur ohne CaCO_3 noch nicht den Maximalwert erreicht, während bei Glykose schon nach 6 Tagen die Werte gleich stehen.

Tabelle XIV. Nährlösung mit 0,1% Agar, mit und ohne CaCO_3 , Glykose und Mannit als Kohlenstoffquellen, Wachstum nach 2—12 Tagen. Stamm G.

Tage	Stickstoffbestimmung in mg							
	Glykose				Mannit			
	ohne CaCO_3		mit CaCO_3		ohne CaCO_3		mit CaCO_3	
2	7,78	7,78	8,21	8,43	8,50	8,36	13,26	13,26
	7,78		8,65		8,21		13,26	
4	9,51	9,58	12,53	12,18	12,53	12,46	18,01	17,72
	9,65		11,82		12,39		17,42	
6	11,82	12,10	11,82	11,67	13,26	13,48	16,70	17,06
	12,39		11,52		13,69		17,42	
12	11,10	11,89	11,38	12,03	15,56	16,13	17,01	17,15
	12,68		12,68		16,70		17,29	

Nährlösung: Glykose 2% (bzw. Mannit), K_2HPO_4 0,1%, MgSO_4 0,05%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01%, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,05 mg/%, Agar 0,1%, und mit oder ohne 0,1% CaCO_3 . 50 ccm Nährlösung in 250er Erlenmeyer, beimpft mit Stamm G, Temperatur 30° C. 4 Stickstoffblindproben im Mittel 0,72 mg, von den Werten in Tabelle XV abgezogen.

Daraus ergibt sich also, daß zwar die CaCO_3 -Wirkung bei genügend langer Kulturzeit durch die Agargabe ersetzt wird, jedoch nicht in den ersten Tagen der Kultur, in denen das CaCO_3 deutlich wachstumsbeschleunigend wirkt. Gerade aber die gleiche Wirkung im gleichen Zeitabschnitt ist auch für die Pyridinwirkung kennzeichnend. Kulturen mit und ohne CaCO_3 können also hinsichtlich der Pyridinwirkung nicht direkt miteinander verglichen werden.

Jedoch fanden RIPPET, STARC und KÖHLER auch bei dem in ihrer Tabelle IV mitgeteilten Versuch in Nährlösung mit Agar und CaCO_3 deutlich die Pyridinwirkung. Die dort erreichten Eiweißwerte erscheinen jedoch insgesamt unter Berücksichtigung der günstigen Nährlösung und der langen Wachstumszeit (5 Tage) gering. Zweifellos wurde mit einem Stamm geringer Anfangsintensität gearbeitet. (Wahrscheinlich mit Stamm J der vorliegenden Untersuchungen?).

Ein entsprechender Kontrollversuch konnte durch die folgenden Ereignisse im Frühjahr 1945 nicht mehr durchgeführt werden. Anschließend konnte durch Ausfall der Gasversorgung nur noch mit Trockensubstanzbestimmungen gearbeitet werden. Ein dreimaliger Versuch, die Trockensubstanz auch in Nährlösung mit Agar zu bestimmen zeigte, daß das nicht möglich ist. Das Sediment wurde bis zur Konstanz getrocknet. Dabei zeigte sich überraschenderweise, daß unbeimpfte Kontrollen bedeutend mehr Trockensubstanz ergaben, als entsprechende mehrere Tage mit *Azotobacter* gewachsene Kulturen. Eine Beurteilung dieser Beobachtung muß weiteren Untersuchungen vorbehalten werden.

Die weiteren Versuche wurden darum durch Trockensubstanzbestimmung in Normallösung mit CaCO_3 jedoch ohne Agar ausgewertet. In dieser Nährlösung verläuft das Wachstum natürlich langsamer. Neben Pyridin wurde dabei *Azotobacter*-Kochsaft geprüft.

Auf die Angaben von R. NILSSON über das Vorhandensein von Cozymase in *Azotobacter* wurde schon hingewiesen. Dieser Autor läßt die Frage der Beziehung der Co-Zymase zu einer von ALLISON, HOOVER und BURK (siehe auch ALLISON und HOOVER, zit. nach NILSSON) in *Azotobacter* gefundenen atmungsfördernden Substanz offen. Diese soll im wachsenden *Azotobacter* synthetisiert und reichlich abgegeben werden, hitzestabil sein und wird als Co-Enzym R bezeichnet (der Co-Enzym-Begriff angeblich jedoch in weiterem Sinne gebraucht als üblich).

Man konnte annehmen, daß z. B. ein solcher aktivierender Faktor bei *Stamm G* vorhanden sei, bei *Stamm IB* jedoch nicht.

Herstellung des Kochsaftes: Massenkultur in Normalglykoselösung, 6 Tage Wachstum. Zwei Stunden bei 2 atü im Autoklav. Dann 48 Stunden im Standzylinder bei kühler Temperatur absitzen lassen, dekantiert und zentrifugiert und das ziemlich klare Zentrifugat zur Herstellung der Nährlösung benutzt.

In mehreren Versuchsserien, die hier nicht einzeln aufgeführt werden können, zeigte sich bei Prüfung nach 2, 4, 6 und 12 Tagen Wachstum, daß bei *Stamm G* eine Wirkung des Pyridins vorhanden ist und auch eine gleiche Wirkung durch 5 ccm Kochsaft desselben Stammes in 50 ccm Nährlösung erzielt wird. Bei *Stamm IB* ist keine wachstumsfördernde Wirkung des Pyridins zu finden und auch keine Wirkung des Kochsaftes von *Stamm G*. Die Ergebnisse kehren auch in einem folgend angeführten Versuche sehr schön wieder, bei dem nur der Zeitpunkt von 4 Tagen Wachstum herausgegriffen wurde, an dem die Wirkung bei den angewendeten Versuchsbedingungen am deutlichsten hervortritt, wie die vorgenannten Versuche zeigten. Außerdem wurden in diesem Versuche noch verschiedene Konzentrationen Pyridin und Kochsaft von beiden Stämmen und gleichzeitig die Wirkung von Kaliumnitrat und Pepton geprüft.

Die Ergebnisse sind in Tabelle XV zu finden und zeigen erneut eine Wirkung von Pyridin bei Konzentrationen zwischen 0,01—0,1 ccm/100 ccm Nährlösung auf *Stamm G*, die gleiche Wirkung von 5 ccm Kochsaft *G* in 50 ccm Nährlösung auf den gleichen Stamm, eine sehr geringe Wirkung von 0,1 ccm Kochsaft *G* in 100 ccm Nährlösung und von 10 ccm Kochsaft *G* in 50 ccm Nährlösung. Zugabe von Kochsaft *IB* scheint keine Wirkung zu haben²⁴.

Bei *Stamm IB* zeigt sich keine deutliche Wirkung des Pyridins, auch nicht bei Zugabe von nur 0,01 ccm in 100 ccm Nährlösung. Der wenig höher liegende Wert bei 3) in Tabelle XV ist unter Berücksichtigung aller übrigen Ergebnisse, auch der vorgenannten Versuche, zweifelhaft. Zugabe von 10 ccm Kochsaft *G* in 50 ccm Nährlösung, 5 ccm Kochsaft

²⁴ Der Mittelwert bei Zugabe von 5 ccm in 50 ccm Nährlösung liegt zwar etwas über dem der Kultur ohne Zusatz, aber das ist kaum als eine spezifische Wirkung anzusehen, besonders bei Vergleich des hohen Wertes bei entsprechender Zugabe von 5 ccm Kochsaft *G* zu *G*, mit sehr gut übereinstimmenden Parallelen.

IB in 50 ccm Nährlösung und 10 ccm Kochsaft *IB* in 50 ccm Nährlösung zeigt eine auffallende Hemmung. Besonders bei Zugabe von Kochsaft *IB* sind die Trockensubstanzwerte äußerst gering. Was hier vorliegt, kann noch nicht gesagt werden.

Tabelle XV.

Stamm G und IB nach 4 Tagen Wachstum in Nährlösung ohne Agar. Zugabe von Pyridin, Kochsaft von Stamm G und IB und KNO₃ und Pepton.

Behandlung der Nährlösung	Trockensubstanz in mg, Blindwerte abgezogen			
	Stamm G		Stamm IB	
1. Normallösung (Glukose)	45,1	52,2	41,7	40,8
2. + 0,01 ccm Pyridin je 100 ccm Nährlösung	59,8		39,8	
3. + 0,05 ccm Pyridin je 100 ccm Nährlösung	49,0	64,3	48,6	40,6
4. + 0,1 ccm Pyridin je 100 ccm Nährlösung	69,6		32,5	
5. + 0,1 ccm Kochsaft G je 100 ccm Nährlösung	68,6	70,0	36,8	42,1
6. + 5 ccm Kochsaft G je 50 ccm Nährlösung	71,3		47,4	
7. + 10 ccm Kochsaft G je 50 ccm Nährlösung	58,7	62,8	36,4	32,4
8. + 5 ccm Kochsaft IB je 50 ccm Nährlösung	66,8		28,3	
9. + 10 ccm Kochsaft IB je 50 ccm Nährlösung	64,0	57,2	34,6	39,3
10. + 25 mg KNO ₃ je 100 ccm Nährlösung	54,3		43,9	
11. + 25 mg Pepton je 100 ccm Nährlösung	78,1	76,4	40,9	41,5
	74,7		42,1	
	69,4	58,8	33,8	29,4
	48,1		25,0	
	64,9	57,0	11,8	9,1
	49,0		6,3	
	32,3	49,2	8,0	17,2
	66,1		26,3	
	83,8	83,5	93,9	91,1
	83,2		88,2	
	85,8	90,7	58,2	61,6
	95,6		65,0	

Blindproben zu 1. 18,0/18,7, im Mittel 18,4, zu 5. 17,9/18,2, im Mittel 18,1, zu 6. 22,0/22,0, im Mittel 22,0, zu 7. 33,0/38,3 im Mittel 35,7, zu 8. 21,8/20,5, im Mittel 21,2, zu 9. 26,2/25,9, im Mittel 26,1, zu 10. 18,9/19,6, im Mittel 19,3, zu 11. 20,2/21,0, im Mittel 20,6. Diese Werte wurden von den Ergebnissen in der Tabelle abgezogen.

Die Zugabe von KNO₃-Stickstoff und Pepton-Stickstoff bewirkt ebenfalls eine Wachstumsbeschleunigung, die sogar noch größer ist als diejenige von Pyridin und Kochsaft. Diese Wirkung ist jedoch bei beiden Stämmen gleichermaßen vorhanden. Das zeigt, daß die vorher beschriebene Wirkung des Pyridins und des Kochsaftes nicht auf einer Stickstoffwirkung beruht.

Für Pyridin war von RIPPEN-BALDES, STARC und KÖHLER schon auf anderem Wege gezeigt worden, daß nicht der Stickstoff des Pyridins wirkt. Auch für den Kochsaft war das zu berücksichtigen, denn zweifellos sind darin auch gewisse Mengen von Stickstoffverbindungen vorhanden.

Fassen wir die Ergebnisse dieser Versuche zusammen: Calciumcarbonat in Nährlösung mit Agar wirkt wachstumsbeschleunigend. In den ersten Tagen des Wachstums kann CaCO_3 nicht durch Agargabe ersetzt werden. Die von RIPPEL-BALDES, STARC und KÖHLER mitgeteilte wachstumsfördernde Wirkung des Pyridins auf *Azotobacter* in den ersten Tagen des Wachstums in Nährlösung mit Mannit läßt sich auch in Nährlösung mit Glykose nachweisen, jedoch nur für *Stamm G* (den Stamm mit der höchsten Anfangsintensität), nicht aber für *Stamm IB*, einen Stamm mit geringer Anfangsintensität des Wachstums. Genau wie Pyridin wirken bestimmte Mengen Kochsaft von *Stamm G*, nicht aber Kochsaft von *IB*.

Es erscheint nach den vorherigen Ergebnissen möglich, daß in *Azotobacter*, *Stamm G*, ein natürlicher, den Stoffwechsel bzw. die Stickstoffbindung aktivierender Faktor vorhanden ist, dessen Wirkung weiter durch Pyridin verstärkt wird und dementsprechend auch ein wirksames Eingreifen des Mehr an Wasserstoff im Mannit gegenüber Glykose nicht unmöglich erscheint, wie es als Ausgangspunkt für diese Untersuchungen vermutet wurde. Dieser „Aktivator“ scheint also in manchen Stämmen natürlich vorhanden zu sein bzw. gebildet zu werden, in anderen nicht. *Stamm G*, der diesen besitzt, zeichnet sich durch große Anfangsintensität der Stickstoffbindung aus, im Gegensatz zu *Stamm IB*, der ihn nicht besitzt. In solchem Stamm kann die Wirkung nicht etwa durch Gaben von Pyridin oder Kochsaft eines Stammes hervorgerufen werden, der dieses Wirksystem natürlich besitzt.

Die letztgenannte Erscheinung ist am schwierigsten zu erklären und die vorliegenden Untersuchungen lassen noch nicht klar entscheiden, welche Gesichtspunkte der folgenden Erörterung wirklich zutreffen und ob die Verhältnisse nicht noch weit verwickelter liegen. Beide Stämme verarbeiten grundsätzlich Glykose und Mannit, nur der zeitliche Verlauf ist verschieden. Man müßte deshalb für beide Stämme einen gleichen normalen Grundstoffwechsel-Mechanismus (Enzysystem) annehmen, der sich in einem Punkte jedoch bei *Stamm G* durch einen weiteren Faktor X unterscheidet, der die normale bei *Stamm G* vorhandene Wachstumsbeschleunigung im Vergleich zum *Stamm IB* bedingt.

Auffallend ist nun, daß diese bereits vorhandene Aktivität des Stammes *G* durch Pyridin und durch Kochsaft des gleichen Stammes noch weiter aktiviert werden kann, *Stamm IB* jedoch nicht. Man könnte demnach annehmen, daß das Vorhandensein des vorher genannten Faktors X bzw. eines Teiles desselben also Voraussetzung für das weiter aktivierende Eingreifen des Pyridins ist, und man kann aus der gleichen Wirkung des Kochsaftes von *Stamm G* schließen, daß das Pyridin bzw. eine entsprechende Wirkgruppe natürlich bei *Stamm G* vorhanden ist, und dann auch als Kochsaft-Faktor erscheint (thermo-

stabil) und so bei Zugabe von Pyridin bzw. dem Kochsaft-Faktor die bereits vorhandene Aktivierung bei *Stamm G* weiter verstärkt wird.

Ferner ergibt sich, daß *Stamm IB* den Kochsaft-Faktor nicht besitzt und auch keinen Rezeptor dafür (nach der vorher gewählten Bezeichnung und Vorstellung also Faktor X), ebenso wenig wie für Pyridin. Dieser Faktor X ist nicht mit dem Kochsaft von *G* auf *Stamm IB* übertragbar und dementsprechend ist anzunehmen, daß er thermolabil oder stammspezifisch oder beides ist.

In den vorigen Erörterungen ist also grundsätzlich ein Zusammenhang zwischen der bereits natürlich vorhandenen Aktivität (Aktivierung?) des Stammes *G* und der nachfolgenden weiteren Aktivierung durch Pyridin und Kochsaft *G* angenommen, was auch am wahrscheinlichsten sein dürfte, da das wirksame Prinzip (oder ein Teil desselben, siehe vorher) sich ja auch im Kochsaft von *Stamm G* findet und nur auf *Stamm G* wirkt, nicht aber auf *Stamm IB* und nicht im Kochsaft von *IB* vorkommt.

Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse kann noch nicht entschieden werden, welche Vorstellungen wirklich zutreffen und ob der Wirkungsmechanismus nicht noch weit komplizierter ist. Man denke nur an die Unterschiede der Stämme in der Verarbeitung verschiedener Kohlenstoffquellen. *Stamm IB* verarbeitet z. B. Glycerin, *Stamm G* nicht. Es scheint deshalb ohne weitere Beobachtungen zwecklos, weitergehende Möglichkeiten von Wirkungsmechanismen zu erörtern.

Jedenfalls geben die vorstehenden Ergebnisse einen ersten Hinweis für eine stoffwechselphysiologische Erklärung der im I. Teil dieser Arbeit gefundenen charakteristischen Unterschiede in der Eigenschaft der Anfangsintensität der Stickstoffbindung aller Stämme. Bei Besprechung des Verlaufes der Kohlenstoffökonomie konnte gezeigt werden, daß der schnelle Wachstumsanstieg bei *Stamm G* in den ersten Tagen im Vergleich zu *Stamm IB* nicht etwa durch einen sich auf die Gesamtleistung bemerkbar machenden Energieverlust erkauft wird. So ergibt sich auch dafür eine Erklärung, indem gezeigt werden konnte, daß bei *Stamm G* ein den Stoffwechsel katalysierendes und aktivierendes System wirksam ist, das zweifellos zeitsparend und dadurch, bezogen auf die Zeiteinheit, ökonomischer arbeitet²⁵.

5. Prüfung von Mannit verschiedener Herkunft.

Im Mannit konnten u. U. wachstumsfördernde Stoffe vorhanden sein und dadurch die höhere Stickstoffbindung je g im Vergleich zu Glykose bedingt sein. Mannit wird nämlich meist als Naturprodukt gewonnen. Von Interesse wäre eine Prüfung von synthetischem Mannit gewesen, der aber leider nicht zur Verfügung stand. Es wurden deshalb aus Manna gewonnener Mannit (Spiritus recryst.) der Firma Merck und aus biologischer Synthese (Pilz) ge-

²⁵ Ähnlich wie auch BORTELS zeigte, daß durch die katalysierende Wirkung des Molybdäns ein ökonomischerer Kohlenstoffverbrauch stattfindet $[C/N = 24/1 \text{ (33/1)}]$.

wonnener Mannit der Firma Henkel verglichen. Die Ergebnisse der Stickstoffbindungsprüfung nach 2 und 7 Tagen stimmten vollkommen überein.

6. Prüfung der Wirkung von gebundenem Stickstoff auf die Größe des Wachstums bei Vergleich von Mannit und Glykose.

Von besonderem Interesse für die Frage der höheren Eiweißbildung je Einheit Mannit gegenüber Glykose war auch die Frage, wie sich dieses Verhältnis bei Gabe von gebundenem Stickstoff gestaltet, und zwar bei Konzentrationen, durch welche die Assimilation des elementaren Stickstoffes sistiert wird, bzw. die ausreichend sind, den gesamten Stickstoffbedarf zu decken.

KOSTYSCHEW und Mitarbeiter fanden: Bei Nährlösung mit $> 15 \text{ mg NH}_3\text{-N}/100 \text{ ccm}$ wird die Stickstoffbindung sistiert; bei Gehalt von $24 \text{ mg Nitrat-Stickstoff}/100 \text{ ccm}$ mit 2% Mannit ist keine Stickstoffbindung möglich. Die gleiche Menge Peptonstickstoff hatte keinen Einfluß. WINOGRADSKY und ZIEMIECKA fanden Sistierung der Stickstoffbindung, wenn mehr als 1,5 Teile Nitrat auf 100 Teile Mannit gegeben wurden. BURK und LINEWEAVER geben die zur Sistierung der Stickstoffbindung nötigen Mengen mit 0,5–1 mg schnell verfügbaren gebundenen Stickstoff an. Sie fanden ebenso Wirkung von NH_3 -Stickstoff, keine von Pepton. Vergl. weiter HANZAWA, ebenso ZOOND (zit. nach RIPPEL) ebenso FULLER und RETTGER.

Tabelle XVI. Wirkung von gebundenem Stickstoff auf die maximale Trockensubstanzbildung bei Mannit und Glykose. Stamm G

Wachstum in Tagen	Stickstoff gegeben in mg je 100 ccm	Trockensubstanz in mg ²¹			
		Mannit		Glykose	
2	—	—	—	57,1	60,2
4	—	126,2	125,9	63,2	90,1
		140,2		97,2	
		122,2		83,0	
6	—	143,8 ²⁷	143,8	107,9	104,0
12	—	142,8	149,4 ²⁸	100,0	106,3
		156,0		108,8	

²⁶ Das Calciumcarbonat der Lösung wurde vor der Bestimmung der Trockensubstanz durch Zitronensäure gelöst. Acht Blindproben ergaben sehr gut übereinstimmende Werte (Mittel 9,3 mg). In der Tabelle ist dieser Betrag nicht abgezogen.

²⁷ Mangel an Mannit gestattete nicht, für alle Kulturen Parallelen anzusetzen, ebenso nicht den Stamm IB in gleicher Breite zu untersuchen wie Stamm G.

²⁸ Der in diesem Versuch benutzte Mannit war in biologischer Synthese gewonnener der Firma Henkel. In einer Kontrolle wurde Mannit aus Manna (Spiritus recryst.) der Firma Merck gegenübergestellt: Mannit aus Manna: 157,6/149,6. im Mittel 153,6 mg (vergleiche auch vorher Abschn. 5).

Tabelle XVI. (Fortsetzung.)

Stamm G

Wachstum in Tagen	Stickstoff gegeben in mg je 100 ccm	Trockensubstanz in mg ²⁹			
		Mannit		Glykose	
Nährlösung mit KNO ₃					
12	36,07 mg = 5 mg N	144,6 147,1	143,8	123,1 117,6	120,4
12	90,17 mg = 12,5 mg N	170,9	170,9	147,1 148,8	148,0
12	180,35 mg = 25 mg N	185,0	185,0	150,5 165,0	157,8
12	360,70 mg = 50 mg N	193,7	193,7	167,5 150,8	154,2
Nährlösung mit (NH ₄) HPO ₄ ²⁹					
12	23,5 mg = 5 mg N	—	124,5	117,4 116,2	116,8
12	58,9 mg = 12,5 mg N	—	106,8	93,4 78,8	86,1 ³⁰
12	117,8 mg = 25 mg N	—	110,9	91,8 97,8	94,8 ³⁰
12	235,6 mg = 50 mg N	—	116,8	114,3 117,6	116,0
Nährlösung mit Harnstoff					
12	26,7 mg = 12,5 mg N	—	168,7	129,5 125,7	126,7
12	53,5 mg = 25 mg N	—	173,1	148,4 146,5	147,5
12	107,0 mg = 50 mg N	—	87,6	106,7 73,2	89,9 ³¹

²⁹ Durch die Gaben an Ammoniumphosphat wurde der Gehalt der Lösung an PO₄ erhöht. Als Kontrolle wurde darum in zwei Kulturen mit 50 ccm Nährlösung die darin enthaltene PO₄-Menge (0,1 % K₂HPO₄) auf eine der Kultur mit 117,8 mg (NH₄)₂HPO₄ (= 25 mg N) äquivalente Gesamtphosphatmenge ergänzt, indem das fehlende Phosphat in Form von Na₂HPO₄ zugegeben wurde: 103,7/102,4, im Mittel 103,1 mg. Der Wert ist mit dem Wert für Glykose ohne gebundenen Stickstoff bei 12 Tagen Wachstum zu vergleichen (106,3 mg). Die Erhöhung an Phosphat ist also ohne Bedeutung.

³⁰ Abfall durch autolytische Vorgänge, Zellen zeigen Stickstoffinvolutionsformen und Auflösungserscheinungen.

³¹ Schlecht gewachsen, nicht autolytisch.

Anm. 26 s. S. 400

Tabelle XVI. (Fortsetzung.)

Stamm G.

Wachstum in Tagen	Stickstoff gegeben in mg je 100 ccm	Trockensubstanz in mg ²⁶			
		Mannit		Glykose	
Stamm IB					
44	—	54,2	58,7	72,2	71,0
		63,1		69,8	
6	—	72,5	72,5	—	—
		72,5			
12	—	144,2	142,8	123,5	126,5
		141,4		129,5	
12	180,35 mg KNO ₃ = 25 mg N	187,6	183,6	143,4	146,9
		179,6		150,4	
12	117,8 mg (NH ₄) ₂ HPO ₄ = 25 mg N	120,0	110,0	72,0	60,7
		100,1		59,5	

Anm. 26 s. S. 400.

In der Hauptsache wurde mit *Stamm G* gearbeitet, für einige Vergleiche wurde auch *Stamm IB* herangezogen. Die Kulturen ohne gebundenen Stickstoff wurden nach 2, 4, 6 und 12 Tagen analysiert. In den Reihen mit gebundenem Stickstoff (es wurden KNO₃, sekundäres Ammoniumphosphat und Harnstoff in Mengen entsprechend 5–50 mg N gegeben) wurden alle nach 12 Tagen nach ihrer Trockensubstanz bestimmt, denn es kam darauf an, die maximale Bildung bei Mannit und Glykose zu vergleichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle XVI zu finden.

In stickstofffreier Normallösung ohne Agar ist der Unterschied der maximalen Trockensubstanzbildung bei Mannit und Glykose deutlich. Sie steigt bei Mannit und Glykose mit steigenden Mengen KNO₃ (5–50 mg N/50 ccm) an, ebenso bei Harnstoff (abgesehen von der anomalen hohen 50 mg-Gabe). Dabei bleibt die in stickstofffreier Lösung sichtbare Unterschiedsspanne zwischen Mannit und Glykose bestehen.

Ammoniakstickstoff in Form von sekundärem Ammoniumphosphat scheint dagegen anders zu wirken. Die Werte für Mannit sind nicht höher als für Glykose ohne Zusatz, für Glykose mit Ammoniak-Stickstoff liegen sie noch etwas darunter. Im Zusammenhang damit steht, daß diese Glykose-Ammoniak-Kulturen im Gegensatz zu den Mannit- und KNO₃- sowie Harnstoff-Glykose-Kulturen sehr starke Stickstoffinvolutionsformen und Auflösungserscheinungen der Zellen zeigten. Das gleiche mikroskopische Bild ergab sich auch in den Kulturen mit 50 mg Harnstoff-Stickstoff mit ebenfalls niedrigem Trockensubstanzgewicht. Die wenigen Ansätze mit *Stamm IB* zeigen die gleichen Wirkungen.

Zusammenfassend läßt sich demnach sagen, daß mit Mannit als Kohlenstoffquelle gegenüber Glykose auch bei Gabe von gebundenem

Stickstoff als Nitrat die Trockensubstanzbildung je Einheit verbrauchter Kohlenstoffquelle höher liegt, während mit $\text{NH}_3\text{-N}$ dieser Unterschied nicht deutlich erscheint. Die vorher für die Stickstofffixierung erörterte Annahme der besseren Wirkung von Mannit infolge des im Vergleich zu Glykose höheren Wasserstoffgehaltes und im Zusammenhang mit einer möglichen H-Aktivierung wird von dem vorstehenden Ergebnis nicht verneint, da ja auch das $\text{NO}_3\text{-Ion}$ auf dem Wege zum Eiweiß hydriert werden muß.

Zusammenfassung.

70 Reinkulturen von *Azotobacter* (darunter 1 *A. vinelandii* und 1 *A. Beijerinckii*) wurden untersucht. Davon stammten 57 aus deutschen und 13 aus osteuropäischen Böden.

Die maximale Stickstoffbindung betrug für alle Stämme (ausgenommen einen) etwa 17,5 mg N je 1 g Mannit. Sehr charakteristisch unterscheiden sie sich jedoch in der Anfangsintensität ihres Wachstums, gemessen nach 2 Tagen, mit Stickstoffgewinnen zwischen 0,34 und 14,15 mg N/1 g Mannit. Die Variationskurve dieser Eigenschaft ist deutlich zweigipflig und bleibt es auch, wenn alle übereinstimmenden Stämme gleicher Herkunft ausgeschieden werden, ebenso für die 13 osteuropäischen Stämme allein. Das spricht für das Vorkommen von zwei natürlichen Formenkreisen. Die Eigenschaften der Stämme blieben in über zweijähriger Kultur absolut konstant.

Die Stämme aus der Gruppe mit hoher Anfangsintensität waren durch mehr stäbchenförmige und stärker bewegliche Zellen ausgezeichnet, die aus der Gruppe mit geringer Anfangsintensität durch größere, runde, unbewegliche Zellen. Die schwarze Pigmentbildung findet sich am intensivsten und regelmäßigsten bei den Stämmen, die in die beiden Maxima der Variationskurve fallen. Beziehungen der Anfangsintensität zu Temperatur, pH-Wert und zu deutlich vorhandenen Spezialanpassungen waren nicht aufzuzeigen. Aus ein und demselben Boden ließen sich mehrere deutlich verschiedene Stämme isolieren.

Der Charakter einer Mischkultur ist allein durch den Stamm mit der höheren Anfangsintensität bedingt. Dieser verdrängt den Stamm mit der geringeren Anfangsintensität aus der Kultur. Daraus ergaben sich bestimmte Gesichtspunkte für die natürlichen Verhältnisse im Boden.

Versuche zur Stammumwandlung ergaben keine Wirkung von Campher, Acenaphthen, Narcotinhydrochlorid und Colchicin. Auch war keine Anpassung an pH, Temperatur und bestimmte Kohlenstoffquellen zu erzielen. Allein Vorkultur auf KNO_3 zeigte Wirkung in Form einer Hemmung der Anfangsintensität der Stämme, die aber auf stickstoffreiem Nährboden nach spätestens 4 Passagen wieder verschwand. Diese induzierte Wirkung liegt in der gleichen Richtung wie die natürlichen Verschiedenheiten der 70 Stämme. Während in künstlicher Kultur die induzierte Wirkung wieder zurückging, können die Unterschiede bei den natürlichen Stämmen als durch die ökologischen Bedingungen induzierte Dauermodifikationen angesehen werden.

Untersuchungen zur Kohlenstoffökonomie ergaben, daß *Azotobacter* eine Induktionszeit besitzt, während der bereits Zucker unökonomisch verarbeitet wird. Diese Zeit war für Stämme mit verschiedener Anfangsintensität verschieden lang, ebenso die folgende Periode des großen Wachstums.

Die Wachstumskurve erreichte jedoch in beiden Fällen annähernd den gleichen Maximalwert mit gleicher Ökonomie der Zuckerverarbeitung (Eiweißkoeffizient um 8,0). Die Wachstumsbeschleunigung der guten Stämme wurde also nicht durch einen Energieverlust erkauft. Die wachstumsbeschleunigende Wirkung von Agar in Nährlösung war auf die Periode des großen Wachstums beschränkt.

Bei Versuchen mit stärker verdünnter Kohlenstoffquelle ergab sich, daß die Ökonomie bei Konzentrationen unter 0,5% fallend abnahm. Die Optimalkonzentration lag bei 0,5–2%.

Je 1 g Mannit wurde im Mittel aller Stämme 17,5 mg, je 1 g Glykose 13 mg, je 1 g Natriumbenzoat 13 mg N gebunden. Eine Beziehung zum Energiewert dieser Substanzen läßt sich nicht aufstellen. Jedoch könnte das Mehr an 2 H-Atomen im Mannit gegenüber Glykose dafür verantwortlich sein. Darum wurde erneut die Wirkung von Pyridin geprüft, jedoch auf 2 Stämme mit unterschiedlicher Anfangsintensität, außerdem wurde *Azotobacter*-Kochsaft berücksichtigt. Beide Stämme reagierten verschieden. Pyridin wirkte auf *Stamm G*, nicht auf *Stamm IB*. Quantitativ genau wie Pyridin wirkten bestimmte Mengen Kochsaft *G* auf *G*, nicht auf *IB*, Kochsaft *IB* wirkte überhaupt nicht. Ebenfalls fördernd wirkten KNO_3 und Pepton, jedoch auf beide Stämme gleichermaßen. Daraus ergibt sich, daß die Pyridin- und Kochsaftwirkung nicht auf einer Stickstoffwirkung beruht. Es wird vermutet, daß die Pyridinwirkung über eine stammspezifische und thermolabile Gruppe, Faktor X, angreift.

Da die Möglichkeit der Aktivierung stammspezifisch ist, so ergibt sich neben der vorher erörterten „ KNO_3 -Hemmung“ ein erster Hinweis für eine stoffwechselphysiologische Erklärung der Unterschiede in der Anfangsintensität der 70 untersuchten Stämme, ebenso für die im Endergebnis, trotz zeitlich unterschiedlich verlaufender Wachstumskurve gleiche Ökonomie bei den Stämmen der beiden Gruppen. Es kann daraus für die guten Stämme ein den Stoffwechsel katalysierender und damit in der Zeiteinheit energiesparend wirkender Faktor gefolgert werden.

Bei Gabe von steigenden KNO_3 -Konzentrationen wurde mit Mannit auch mehr Trockensubstanz gebildet im Vergleich zu Glykose als Kohlenstoffquelle, während mit Ammoniakstickstoff kein deutlicher Unterschied festzustellen war.

Literatur.

- ALTON, R. A.: J. agricult. Sci. **26**, 268 (1936).
 BACH, A., JERMOLJEW, L. u. STEPANJAN, M.: Cbl. f. Bakt. II, **91**, 54 (1934/35). — BAUCH, R. [1]: Naturwiss. **29**, 503 (1941). — BAUCH, R. [2]: ebenda, **29**, 688 (1941). — BAUCH, R. [3]: Wochenschr. f. Brauerei, Nr. 1 u. 2, (1942). — BAUCH, R. [4]: Ber. dtsh. bot. Ges., **60**, 42 (1942). — BEIJERINCK, M. W. [1]: Cbl. f. Bakt. II, **7**, 561 (1901). — BEIJERINCK, M. W. [2] u. A. v. DELDEN: Cbl. f. Bakt. II, **9**, 3 (1902). — BERGEY: Manual of Determinative Bacteriology, 5. Ausg. London 1939. BIRCH-HIRSCHFELD, L.: Diese Zeitschr. **3**, 342 (1932). — BORTELS, H. [1]: Diese Zeitschr. **1**, 333 (1930). — BORTELS [2]: Cbl. f. Bakt. II, **95**, 193 (1936); ebenda **100**, 373 (1939). — BURK, D. u. H. LINEWEAVER: J. Bact., **19**, 383 (1938).

- CHOLODNY, D.: Diese Zeitschr. **1**, 620 (1930). — CONN, J. H.: N. Y. Agr. Exp. Stat. Geneva, Techn. Bull. **64** (1918) u. J. Bakt., **17**, 399 (1929). — CURIE, J. H.: Soil Sci. **32**, 9 (1931).
- DEN DOOREN DE JONG, L. E.: Diese Zeitschr. **9**, 223 (1938). — DHAR, N. R.: Address of the anniversary meeting 1937. — DIANOWA, E. W. u. A. WOROCHILOWA: Cbl. f. Bakt. II, **84**, 433 (1931).
- EBERT, B. P. u. N. N. RUBEL: Arch. Sci. Biol. **33**, 353 (1933). Ref. Cbl. f. Bakt. **90** (272).
- FEHÉR, D.: Untersuchungen über die Mikrobiologie des Waldbodens. Berlin 1933. — FOERSTER: Cbl. Bakt. II, **11**, 257 (1892). — FULLER, J. E. u. F. RETTGER: Soil Sci. **31**, 219 (1931).
- GAINAY, P. L. [1]: Zeitschr. f. angew. Chem. **40**, 1060 (1927). — GAINAY, P. L. [2]: Ann. of the Miss. Bot. Garden. **15**, 113 (1928). — GAINAY, P. L. [3]: Soil. Sci. **42**, 445 (1937). — GREENE, R. A.: Soil. Sci. **33**, 153 (1932). — GUITTONNEAU, G. u. R. CHEVALIER [1]: C. r. Acad. Sci. Paris, **203**, 211 (1936). — GUITTONNEAU, G. u. R. CHEVALIER [2]: ebenda **203**, 1400 (1936).
- HANZAWA: Cbl. f. Bakt. II, **41**, 573 (1914).
- JANKE, A. F. SEKERA u. A. SZILVINGI [1]: Diese Zeitschr. **5**, 223 (1934). — JANKE, A., u. M. WOZAK [2]: ebenda, **5**, 338 (1934).
- KEDING: Wiss. Meeresunters. Abt. Kiel. N. F. **9**, 275 (1906). — KEUTNER, J.: ebenda, **8**, 29 (1905). — KLUYVER, A. J. u. J. v. REENEN: Diese Zeitschr. **4**, 280 (1933). — KLUYVER, A. J. u. M. T. v. D. BOUT, ebenda: **7**, 261 (1936). — KOCH, A. u. S. SEYDEL: Cbl. f. Bakt. II, **31**, 570 (1912). — KORINĚK, J.: Cbl. f. Bakt. II, **86**, 201 (1932). — KOSTYSCHEW, S., A. R. RYSKALTSCHUK u. O. SCHWEZOWA: Zeitschr. f. physiol. Chem. **154**, 1 (1926) und C. r. Acad. Sci. Paris, **180**, 2070 (1925). — KRAUSE, W.: Planta **31**, 91 (1940). — KRISHNA, P. G.: Cbl. f. Bakt. II, **76**, 228 (1928). — KRZEMIENIEWSKI, S.: Anz. Akad. Wiss. Krakau. Math.-Naturwiss. Kl. **9**, 929 (1908). — KUBIENA, W. [1]: Diese Zeitschr. **3**, 507 (1932). — KUBIENA, W. [2] u. CH. E. RENN: Cbl. f. Bakt. II, **91**, 267 (1934/35). — KUBO, H.: Acta phytochim. **10**, 219 (1938).
- LIPMANN, J. G.: N. J. Agr. Exp. Rpt. **24**, 217 (1903) und 25th Ann. Rpt. 237 (1904). — LÖHNIS, F. u. T. WESTERMANN: Cbl. f. Bakt. II, **22**, 234 (1908). — LÖHNIS u. I. HANZAWA, ebenda: **42**, 68 (1914).
- METZEN, O. v.: ebenda **94**, 142 (1936). — MEYERHOF, O. u. D. BURK: Zeitschr. physik. Chemie **139**, 117 (1928). — MISCHUSTIN, E. N. u. S. I. BACHARJEW: Mikrobiologija (russ.) **8**, 1063 (1936). Ref. Cbl. f. Bakt. II, **104**, 30 (1941). — MOCKERIDGE, F. A.: Biochem. J. **9**, 272 (1915) und Ann. Bot. **26**, 871 (1912). — MOLÉR, T.: Bot. Not. **4**, 168, (1915).
- NIEL, C. B. VAN: Diese Zeitschr. **6**, 215 (1935). — NIEMEYER, L.: Bot. Arch. **7**, 347, (1924). — NILSSON, R.: Diese Zeitschr. **7**, 598, (1936).
- OMELIANSKI, W. L. u. O. P. SSEWEROWA: Cbl. f. Bakt. II, **29**, 643 (1911).
- PELLEGRINI, G.: Diese Zeitschr., **9**, 545 (1938). — POTTHOFF, H.: Cbl. f. Bakt. II, **55**, 9 (1922) u. **61**, 249 (1924). — PRAZMOWSKI, A.: Akad. Wiss. Krakau, Math.-Naturwiss. Kl. 1912, S. 855 und Cbl. f. Bakt. II, **37**, 299 (1913).
- RABOTNOWA, I. L.: Mikrobiologija (russ.) **10**, 526 (1941). (Ref. Cbl. f. Bakt. II, **105**, 272 (1942). — REUSZER, H. W.: Cbl. f. Bakt. II, **103**, 243 (1941) (Ref.). — RIPPEL, A. [1]: Niedere Pflanzen, in Blanck: Handbuch der Boden-

lehre Bd. 7, Berlin 1931. — RIPPPEL, A. [2]: Diese Zeitschr. 7, 201 (1936). [3] ebenda 7, 590, (1936). — RIPPPEL, A. [4]: Mikrobiologie des Bodens, in Blanck Handbuch der Bodenlehre, I. Erg. Bd. Berlin 1939. — RIPPPEL, A. u. W. FISCHER: Nachr. Akad. Göttingen, Math.-Physik. Kl. Biol. Abt. 1946, S. 1. — RIPPPEL, A. u. H. LOHRMANN: Nachr. d. Ges. d. Wiss. Göttingen. Math.-Physik. Kl. Bd. 33, 239 (1940). — RIPPPEL, A. u. O. LUDWIG: Cbl. f. Bakt. II, 64, 161 (1925). — RIPPPEL, A. u. K. NABEL: Diese Zeitschr. 10, 359 (1939). — RIPPPEL, A. u. A. STARC u. W. KÖHLER: Diese Zeitschr. 13, 365 (1943). — ROBERG, M. Jb. Bot. 83, 567 (1936). — ROSSI, G.: Soil Sci. 41, 53 (1936). — RUBENTSCHIK, L. u. M. E. ROJSIN: Die Veränderlichkeit der Mikroben und Bacteriophagien Kiew 1939, (ukrainisch). Ref. in Cbl. f. Bakt. II, 104, 371 (1942).

SCHELOUMOWA, A. M.: Mikrobiologija (russ.) 10, 33 (1941). Ref. in Cbl. f. Bakt. II, 104, 285 (1940) u. 105, 151 (1942). — SCHROEDER, M.: Cbl. Bakt. II, 50, 44 (1920). — SMITH, N. R.: J. Bact. 30, 323 (1935). — STAPP, C.: Cbl. Bakt. II, 106, 338 (1944). — STAPP, C. u. G. RUSCHMANN: Arb. biol. Reichsanst. Land- u. Forstw. 13, 305 (1924). — STARC, A.: Diese Zeitschr. 13, 164 (1943). — STERN, E. A. u. N. N. SUSHKINA: Mikrobiologija (russ.) 5, 253 (1936) (engl. Zusammenfassung).

THOMPSON, L. G.: J. Agricult. Res. 45, 149 (1932).

WAKSMAN, S. A.: Principles of Soil Microbiology. London 1927. — WENZL, H. [1]: Diese Zeitschr. 5, 358 (1934). — WENZL, H. [2]: Cbl. Bakt. II, 89, 353 (1934). — WENZL, H. [3]: ebenda, 90, 289 (1934). — WILSON, J. K. u. B. D. WILSON: Cornell Univ. Agricult. Exp. Stat. Mem. 148, (1933). — WINOGRADSKY, S. [1]: Ann. Inst. Pasteur, 40, 455 (1926) ferner, C. r. Acad. Sci. Paris 187, 161, (1928), ferner Ann. Inst. Past. 39, 299 (1925). — WINOGRADSKY, S. [2]: Soil. Sci. 25, 37 (1928). — WINOGRADSKY, S. [3]: Ann. Inst. Past. 48, 89 (1932). — WINOGRADSKY, S. [4]: Soil. Sci. 40, 59 (1935). — WINOGRADSKY, S. [5]: C. R. Acad. Paris 203, 10 (1936). — WINOGRADSKY, S. [6]: Ann. Inst. Past. 60, 351 (1938). — WINOGRADSKY, S. [7]: ebenda, 66, 97 (1941). — WINOGRADSKY, S. [8]: C. R. Acad. Sci. Paris, 182, 907 (1926). — WINOGRADSKY, S. u. J. ZIEMIECKA: Ann. Inst. Past. 42, 36 (1928).

YAMAGATA, N. u. A. ITANO, J. Bact. 8, 526 (1923).

(Aus den Botanischen Anstalten in Göttingen.)

Über die Verbreitung der Erddiatomeen*

Von

INGE BRENDEMÜHL.

Mit 10 Textabbildungen.

(Eingegangen am 1. Dezember 1947.)

Untersuchungen über die Algenflora des Erdbodens sind in neuerer Zeit immer häufiger gemacht worden (FRANCÉ, 1921, KOLBE, 1932, GISTL, 1932, 1933, FEHÉR, 1933, PETERSEN, 1935, SCHELHORN, 1936, JOHN, 1942, WEINTRAUT, 1943). Hierbei wurde Wert darauf gelegt, das Vorkommen nicht nur aller *Algenklassen*, sondern meist auch das von *Pilzen* und *Bakterien* festzustellen, die Beziehungen zueinander zu klären und die Arten zu bestimmen. Hierzu sagt HUSTEDT (1934): „Diese Methode muß sich für jede Algengruppe nachteilig auswirken, nicht nur, daß notgedrungen Bestimmungsfehler oder systematische Unrichtigkeiten in größerer Zahl vorkommen müssen, sondern die Listen werden in fast allen Gruppen unvollständig sein und in der Regel nur die alltäglichen Formen enthalten“. Es ist daher zu vermuten, daß auch die bisher bekannt gewordenen Diatomeenlisten der Erdböden (FRANCÉ, 1921, PETERSEN, 1935, JOHN, 1942) sehr unvollständig sein werden, zumal die Erddiatomeen meist sehr klein (GISTL, 1932, KOLBE, 1932, PETERSEN, 1935) und daher schwer bestimmbar sind.

In der vorliegenden Arbeit ist deshalb eine möglichst genaue Erfassung aller *Erddiatomeen* angestrebt. Außerdem sollte die Abhängigkeit des Diatomeenvorkommens von verschiedenen Umweltbedingungen festgestellt und ermittelt werden, ob verschieden geartete Böden eine charakteristische Diatomeenflora besitzen.

I. Methodik.

A. Herstellung der Kulturen.

1. Sammeln der Böden.

Die 167 untersuchten Erdproben stammen von den verschiedensten Standorten (Äcker, Wiesen, Halden, Wege, Laub- und Nadelwälder, Ufer, Grabenränder, Teiche, Tümpel usw.). Sie wurden während der Zeit von Mai 1943 bis September 1944 gesammelt, und zwar in Göttingen und seiner Umgebung (Meißner, Hoher Hagen, Kaufunger Wald), sowie in Bad Elster,

* Teilergebnisse einer Dissertation der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät in Göttingen. Die ausführliche Arbeit mit zahlreichen Standortlisten ist in der Göttinger Universitäts-Bibliothek niedergelegt.

Würzburg, Burghausen-Salzach, Salzburg, auf der Insel Wollin und im Hils. Wenige Proben aus dem Schwarzwald, Reinhardswald und einige aus dem Harz wurden freundlichst zur Verfügung gestellt. Sie stammen alle von der Erdoberfläche bis zu einer Tiefe von etwa 5 cm. Als Sammelgefäße dienten cylindrische Gläser (\varnothing etwa 5 cm und Höhe 10 cm), die mit Korken verschlossen waren.

2. Anreicherungskulturen auf Agar.

Um Diatomeen zu bestimmen, muß man Dauerpräparate machen. Ihre Kieselpanzerstruktur muß für das Bestimmen genau sichtbar sein, was aber in der Natur nur selten, sondern in der Regel nur in Glühpräparaten oder anders hergestellten Dauerpräparaten der Fall ist. Dazu müssen von Erddiatomeen zunächst Anreicherungskulturen gemacht werden.

a) Nährlösung und Bereitung der Agarplatten.

Die verschiedenen Autoren (SCHELHORN, 1936, FEHER, 1942, JOHN, 1942, WEINTRAUT, 1943) haben mancherlei Methoden und Nährlösungen für ihre Algenkulturen benutzt. In der vorliegenden Arbeit wurden Agarplatten für die Anreicherungskulturen angewendet, die mit besonders für Diatomeen modifizierter „Erdschreiber-Lösung“ bereitet waren, während die quantitative Bestimmung in Flüssigkeitskulturen stattfand. Anfänglich wurden außerdem auch noch Gipsplatten (PRINGSHEIM, 1926) verwendet; sie ergaben keine wesentlich anderen Resultate.

Herstellung der Nährlösung nach dem etwas abgeänderten Verfahren von HAMMERLING (1931), bei dem die Methoden von PRINGSHEIM und SCHREIBER (vgl. auch FOYN, 1934) kombiniert sind: 3 kg gesiebte, halbfeuchte Komposterde werden mit 3 l destillierten Wassers angesetzt und drei Stunden im Dampftopf gekocht. Nach drei Tagen wird die Erdlösung vorsichtig abgegossen, filtriert, in Erlenmeyerkolben gefüllt und fraktioniert sterilisiert ($3 \times \frac{1}{2}$ Stunde nach je 24 Stunden). Nach etwa 14 Tagen wird die Erdlösung vorsichtig in einen frischen Kolben abgegossen, so daß der Satz zurückbleibt, und sterilisiert. Nach 14 Tagen dieselbe Prozedur. Diese „Rohlösung“ wird kühl aufbewahrt und kann zur Herstellung der Erdschreiberstammlösung verwendet werden: 200 ccm Rohlösung + 0,2 g NaNO_3 + 0,04 g Na_2HPO_4 + 1800 ccm Leitungswasser, dazu noch 0,16% Natrium-Wasserglas (3,2 ccm auf 2 l). Zur Festigung werden 1,8% gewässerter Agar (RICHTER, 1903) zugesetzt und damit Petrischalen in $\frac{1}{4}$ cm hoher Schicht unter möglichster Vermeidung von Kondenswasser am Schalen- deckel gegossen.

b) Ansetzen der Böden.

Zur Vorbereitung für die Impfung der Agarplatten wurden die Erdproben in ausgeglühten Sieben gesiebt (Porenweite des Siebes etwa 1 qmm). Damit das Sieben etwas leichter ging, wurde zu feuchte Erde einige Zeit bei Zimmertemperatur offen stehen gelassen, bis sie die geeignete Trockenheit erreicht hatte. Etwa 1 ccm der gesiebten Erde wurde dann mit einem sterilisierten Löffelchen auf die Mitte einer Agarschale übertragen. Drei oder mehr Schalen übereinander wurden in einem kühlen Erdgewächshaus (sogen. Mooshaus) mit der durchschnittlichen Temperatur von 15–18°C an der Nordwestseite des Institutes aufgestellt und zum Schutz gegen Austrocknung

mit einer Glasglocke bedeckt. Im Hochsommer wurde die abendliche Sonne, aber auch das grelle Tageslicht durch Rollos aus Holzleisten abgehalten (RICHTER, 1903, 1906). Anfänglich wurden von jedem Boden gleichzeitig sechs Ansätze gemacht, später stellte sich heraus, daß drei genügen. Die Diatomeen kriechen nach einiger Zeit aus der Erde auf den Agar hinaus, vermehren sich hier wie auch wohl schon in der Erde und können so erfaßt werden.

3. Flüssigkeitskulturen.

Durch die nicht quantitative Agarplattenmethode sollte nur die Anwesenheit der Arten festgestellt werden. Ihre Mengenbestimmung wurde durch Flüssigkeitskulturen vorgenommen. Die Erden wurden sofort nach dem Einsammeln verarbeitet, um so den natürlichen Zellenbestand zu erfassen, ohne daß nach der Entnahme eine Vermehrung oder Verminderung der Individuenzahl hatte eintreten können. Beim Beginn der Arbeit wurden Flüssigkeitskulturen allerdings noch nicht verwendet, später, und zwar beim größten Teil der Erden, wurden sie aber stets parallel zu den Agarkulturen angesetzt. Dabei erwies sich die Methode von PETERSEN (1928, 1935) als die zweckmäßigste: 5 ccm der gesiebten Erde wurden mit 50 ccm steriler Nährlösung (die gleiche wie bei den Agarkulturen) in einem Erlenmeyerkolben aufgeschlämmt und 20 Min. in einem Schüttelapparat tüchtig vermischt. Von dieser Aufschlämmung (1:10) wurden dann 7 je 10fach ansteigende Verdünnungen in Nährlösung hergestellt, so daß also die Abstufungen 1:100 (Nr. 1), 1:1000 (Nr. 2), 1:10 000 (Nr. 3), 1:100 000 (Nr. 4), 1:1 000 000 (Nr. 5), 1:10 000 000 (Nr. 6) und 1:100 000 000 (Nr. 7) entstanden. Von diesen Verdünnungen wurden je 5 ccm in sterile, mit Wattebausch verschlossene Reagenzgläser gefüllt. Die Reagenzgläser lagen (durch eine etwa 2 cm hohe Leiste schräg gestellt) während der Versuchsdauer im gleichen Versuchsraum wie die Agarschalen auf einer Unterlage von weißem Papier. Um den möglichen Einfluß des Lichtes zu variieren, wurde die Hälfte der Gläser (1a, 2a, 3a usw.) mit weißem Pergament bedeckt, die übrigen (1b, 2b, 3b usw.) wurden als Parallelkulturen dem direkten Licht ausgesetzt.

B. Beobachtung der Kulturen.

a) auf Agar.

Die Agarplatten zeigten bei mikroskopischer Betrachtung von der Unterseite der Schalen in den Frühjahrs- und Sommermonaten schon nach wenigen Tagen Entwicklung verschiedenster *Algen*. Später wurde der Bewuchs dann auch makroskopisch sichtbar. Sämtliche Schalen blieben drei Monate oder länger stehen, um auch langsam wachsende Formen zur Entwicklung kommen zu lassen. Sobald genügend Diatomeen im Umkreis um den Erdhäufen erschienen waren, wurden Dauerglühpräparate (s. C) angefertigt. Das wurde dann später meist noch mehrmals, auf jeden Fall aber vor der endgültigen Beseitigung der Platten wiederholt und zwar auch von solchen, die keine Diatomeenentwicklung zeigten, um vielleicht durch das säubernde Glühen solche Diatomeenpanzer doch noch sichtbar zu machen, die durch das allgemeine Algengewirr verdeckt waren.

b) in Flüssigkeit.

Auch die Reagenzgläser zeigten meistens mit dem bloßen Auge erkennbare vielfarbige Algenentwicklungen; sie wurden vor der mikroskopischen

Untersuchung kräftig geschüttelt und der an den Wänden sitzende Algenbelag gelöst. Die Entnahme der Flüssigkeitsproben zum Mikroskopieren geschah mit einer Metallöse, die nach jedem Gebrauch ausgeglüht und sehr sorgfältig abgepinselt wurde. Jede Verdünnungsstufe wurde nach Diatomeen durchsucht. Fanden sich in den Verdünnungen Nr. 1 (1:100) Diatomeen, so mußten in 1 ccm der Erdprobe durchschnittlich mindestens 100 Diatomeenzellen enthalten gewesen sein, traten sie noch in Verdünnung 2 auf, mindestens 1000, in 3 10 000, in 4 100 000, in 5 1 Mill., in 6 10 Mill. und in Verdünnung 7 100 Mill. Keime. Zwischenwerte sind bei dieser Methode kaum zu ermitteln. Nach anfänglich häufigerer Untersuchung der Reagenzgläser stellte sich jedoch heraus, daß es am richtigsten ist, die Gläser erst lange völlig unberührt liegen zu lassen und nur das makroskopische Bild zu protokollieren. Erst nach drei Monaten oder später wurden Flüssigkeitsproben der Gläser dann mikroskopisch auf ihren Diatomeengehalt untersucht. Man ist auf diese Weise sicher, daß sich alles genügend entwickelt hat.

C. Dauerpräparate und Bestimmen der Formen.

Das Herstellen der Dauerglühpräparate geschah nach der Methode von HUSTEDT (1930)¹: Einige Tropfen aus den gut geschüttelten Reagenzgläsern bzw. dünne Stückchen von der Oberfläche des Agars aus dem Umkreis des Erdhaufens wurden auf Deckgläser gebracht und gut verteilt. Die Flüssigkeit (der Agar wurde mit etwas destill. Wasser benetzt) verdunstete bei gewöhnlicher Temperatur. Die trockenen Deckgläser kamen dann auf ein dünnes Eisenblech, welches auf einem Dreifuß mit der entleuchteten nicht rauschenden Flamme eines Bunsenbrenners zum Glühen gebracht wurde. Die organischen Substanzen auf den Deckgläsern werden schnell schwarz (verkohlen), aber allmählich „infolge vollständiger Verbrennung dieser Stoffe wieder klar“. Diese Säuberung dauert etwa 20 Min., oft länger. Einbettungsmedium war Styrax. Die Deckgläser wurden mit einem Tropfen des Mittels bedeckt, dieses „unter Zuhilfenahme künstlicher Wärme“ eingedickt und auf erwärmte Objektträger gelegt. Nach dem Erkalten muß das Deckglas fest aufliegen. Beim Bestimmen der Arten, das erst nach Beendigung des züchterischen Teiles der Arbeit vorgenommen werden konnte, erwies sich Styrax als nicht immer ausreichend für das Erkennen der äußerst zarten Struktur sehr kleiner Erddiatomeen (vgl. HUSTEDT, 1934). Deshalb mußten Trockenpräparate von diesen unsicheren Arten angefertigt und Umbettung in Medien mit größerem Brechungsindex wie Hyrax vorgenommen werden. Bestimmt wurde hauptsächlich nach PASCHERS „Süßwasserflora Deutschlands“, Band Diatomeen, bearbeitet von HUSTEDT (1930); außerdem wurde der Diatomeenatlas von A. SCHMIDT (1874—1941) und RABENHORSTS Kryptogamenflora (Kieselalgen von HUSTEDT, 1927) zu Hilfe genommen.

D. Bestimmung der Bodenreaktion.

Die pH-Bestimmung der Böden wurde mit dem Ionometer von Lautenschläger vorgenommen (DEINES und KURBIS, 1935, ELLENBERG, 1939, STEINER, 1941). Dazu wurde in 100 ccm-Erlenmeyerkolben eine etwa 1 cm hohe Erd-

¹ Herr Dr. HUSTEDT war so freundlich, mir persönlich alle erforderlichen Anweisungen zu geben und auch die Nachbestimmung bzw. Neubestimmung der unsicheren Arten zu übernehmen. Dafür und für seine stete und vielseitige Hilfe sei ihm auch an dieser Stelle herzlich gedankt.

schicht mit ungefähr der doppelten Menge destillierten Wassers (in einem zweiten Kolben das gleiche mit KCl) aufgeschlämmt, geschüttelt und über Nacht stehen gelassen. Zur Bestimmung wurden wenige ccm Flüssigkeit abgossen, mit Chinhydron versetzt und so schnell wie möglich gemessen. Größtenteils änderte sich sehr bald der Wert; aber nach verschiedenen Versuchen zu urteilen, muß man doch den ersten für den richtigen halten. Wo nachstehend nur ein pH-Wert angegeben ist, ist es der mit Aq. dest. bestimmte.

II. Ergebnisse.

A. Besiedlungsdichte.

1. Besiedlungsdichte in der Gesamtzahl der Böden.

a) In Flüssigkeit.

Von den 167 Bodenproben ergaben 37, d. h. 22,1%, keine Entwicklung von Diatomeen in den Flüssigkeitskulturen.

Sie stammten von den verschiedensten Standorten aus entfernt voneinander gelegenen Gegenden Deutschlands, z. B. Hoher Hagen bei Göttingen, Fichtenwald, Südhang, viel Nadeln (pH 4,6; März); Buchenwald, Bocksühl bei Friedland (Göttingen), Nordhang, Buntsandstein (pH 6,2; Februar); Acker mit jungem Roggen bei Warnow, Insel Wollin, sog. „Zielow“, unbeschattet (pH 5,5; April); Düne am Ostseestrand bei Misdroy, unbeschattet, Bewuchs: Strandhafer (pH 7,2; April).

Weitere 50% der Erdproben enthielten 100, 1000 und 10 000 Keime je ccm Erde. Stärkere Besiedlung war im großen ganzen um so seltener, je größer die Keimzahl war (100 000 Zellen 10,7%, 1 Million 4,1%, 10 Millionen 3,3%, 100 Millionen 6,6%).

Zu den stärksten besiedelten gehörten auch wieder Erden der verschiedensten Standorte, z. B. enger Burghof, Hohensalzburg, von hohen Mauern umgeben, schattig (pH 6,9; Juni); Botanischer Garten in Göttingen, Gartenweg an der Südseite des Institutes (pH 7,5; Februar); Wiese an der Elster, Glimmerplättchen, mehrere Meter vom Ufer entfernt, von Weiden und Birken beschattet, Bewuchs: viel *Anthriscus* (pH 5,4; Juni); Acker mit jungem Getreide bei Burghausen/Salzach (pH 6,8; Juni); Straßenböschung mit Rinnsal in Laubach, Buntsandstein (pH 5,9; Februar).

Offenbar sind mehr als 10 000 Diatomeen je ccm Erde also schon relativ selten.

b) Auf Agar.

Innerhalb der ersten Wochen war die Diatomeenentwicklung auf den Agarplatten ähnlich wie in den Flüssigkeitskulturen. $\frac{1}{3}$ der Erdproben ließ auch bei genauer mikroskopischer Kontrolle keinen Diatomeenbewuchs erkennen, die übrigen zeigten zunehmende Besiedlungsstärke bis zu den letzten 7%, die makroskopisch eine geschlossene braune Decke zeigten. Bei monatelangem Stehenlassen der Kulturen kamen dann aber in einem Teil der anfänglich diatomeenfreien Schalen doch noch Kolonien zur Entwicklung, so daß der Prozentsatz der diatomeenlosen auf 17% herabging und die Anzahl der dicht bewachsenen auf 33% abstieg. Die Diatomeen vermehrten sich auf den Agarplatten offenbar relativ

stark, so daß alle Werte allmählich zu hoch wurden; die Flüssigkeitskulturen dürften daher für quantitative Ermittlungen zuverlässigere Werte liefern. Trotzdem hat auch die Agarmethode ihre Bedeutung, und zwar vor allem in qualitativer Hinsicht zur Erfassung seltener Arten².

2. Einfluß verschiedener Faktoren.

Die wenigen oben angeführten Einzelbeispiele der Besiedlungsdichte einzelner Böden lassen keine Schlüsse über die Rolle einzelner

Außenfaktoren zu. Aus der Gesamtheit der Beobachtungen ergibt sich aber, daß vor allem 2 Faktoren große Bedeutung für die Verteilung der Diatomeen im Erdboden haben, nämlich die Bodenreaktion und der Feuchtigkeitsgehalt.

a) Bodenreaktion.

Sowohl die Flüssigkeits- wie die Agarkulturen (die nachfolgenden Zahlen stammen von ersteren) ergaben eindeutig stärkere Diatomeenentwicklung bei hohen pH -Werten. 39% der Böden des pH -Wertes 7,9—7,0 hatten sehr starken Diatomeengehalt; bei niedrigem pH nahm der Prozentsatz der Böden mit großer Diatomeenzahl je ccm Erde ab (bei 6,9—6,0 noch 32%, bei 5,9—5,0 nur noch 18%), und bei pH unterhalb von 4,9 war überhaupt kein Boden mehr stark besiedelt. Bei diesen niedrigen pH -



Abb. 1. Entwicklung auf Agar. Anteil der Böden mit starkem (breite Säule), mittlerem bis schwachem (schmale Säule) und fehlendem Diatomeenbewuchs (Linie) in Prozent (Zahlen neben den Säulen) der vier Gruppen sehr feuchter, feuchter, mitteltrockener und trockener Böden.

Werten überwogen hingegen die völlig diatomeenfreien Böden: 58% von ihnen waren gänzlich ohne Kieselalgen; bei 5,9—5,0 waren auch noch 39% diatomeenfrei, bei pH 6,9—6,0 waren es dann nur noch 4% und oberhalb pH 7,0 waren alle besiedelt. Die Diatomeen bevorzugen also ganz eindeutig Böden von alkalischer Reaktion.

b) Feuchtigkeit.

Teilt man die Böden in vier Gruppen ein³: 1. sehr feuchte bzw. nasse, 2. feuchte, 3. mitteltrockene, 4. trockene und trägt in einem

² Nach Joux (1942) soll die Kultur in feuchter Erde in Petrischalen besonders gute Resultate liefern; ich verfüge über keine eigenen Erfahrungen damit.

³ Da auch nach Regen bzw. Schnee Erdproben gesammelt wurden, war es zweckmäßiger, diese Einteilung nicht nach Wassergehaltsbestimmung vorzunehmen, sondern Lage und Art des Standortes entscheiden zu lassen.

Koordinatensystem dazu den Prozentsatz mit starkem, mittlerem bis schwachem und fehlendem Diatomeenbewuchs auf den Agarplatten ein, so erhält man Abb. 1. In ihr sind die starken Entwicklungen des Bewuchses durch starke Säulen, die anderen beiden durch abnehmend schwächere Linien dargestellt. 90% der nassen Böden ergaben starken Bewuchs, von den trockenen waren es nur 30%. Bei letzteren blieben dagegen fast 40% ohne jegliche Diatomeenentwicklung, bei den Böden von nassen Standorten dagegen nur 10%. Im übrigen zeigt ein Blick auf die Abbildung besser als viel Worte, wie mit zunehmender Trockenheit der Böden die Anzahl der Erdproben mit starker und mittlerer Bewuchsdichte zurückging und die der diatomeenfreien zunahm.

c) Standorte.

Aber auch noch andere Faktoren als die Bodenreaktion und die Bodenfeuchtigkeit übten einen eindeutigen Einfluß auf die Masse des Diatomeenbewuchses aus. Nachstehend sind die Böden in 5 Gruppen eingeteilt:

1. wasserreiche Standorte (Ufer, Tümpel, Grabenränder usw.);
2. kultiviertes Land und zwar a) Äcker, b) Wiesen;
3. ruhendes Land (Wegböschungen, Halden, Rasen und dgl.);
4. Laubwälder;
5. Nadelwälder.

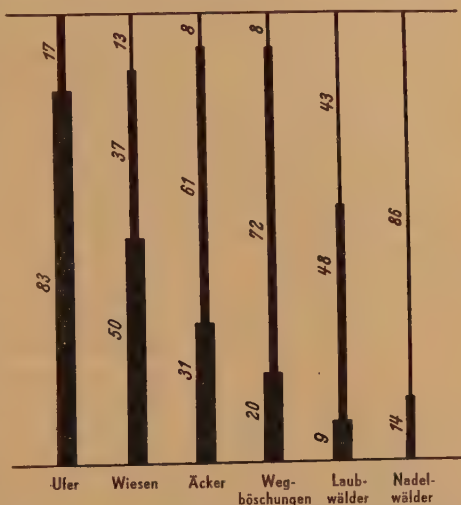


Abb. 2. Entwicklung in den Flüssigkeitskulturen. Prozentualer Anteil (Zahlen neben den Säulen) der Böden mit sehr starkem bis starkem (Verdünnung 4—7, breite Säule), mittlerem bis schwachem (Verdünnung 1—3, schmale Säule) und fehlendem (0, einfache Linie) Diatomeenbewuchs an den Standorten: Ufer, Äcker, Wiesen, Wegböschungen, Laub- und Nadelwälder.

Am stärksten besiedelt waren, wie nicht anders zu erwarten, die wasserreichen Standorte (Abb. 2). In den Flüssigkeitskulturen, die der Abbildung zu Grunde liegen, zeigten über 80% der Proben von feuchten Standorten Entwicklung noch in den Verdünnungen 4—7 (mindestens 100 000 bis 100 Millionen Zellen je ccm Erde). Der Rest war nur mittelmäßig bis schwach besiedelt (Entwicklung nur bis Verdünnung 1—3; mindestens 100 bis 10 000 Individuen in einem ccm Erde). Erdproben ohne Diatomeenbewuchs fehlten ganz. Wenn man die sauren Tümpel mitberücksichtigt, die bei der Zusammenstellung in der Abbildung weggelassen sind, fällt der Prozentsatz der stark besiedelten Böden allerdings auf 50% zugunsten derjenigen mit einer schwächeren Diatomeenentwicklung (bis Verdünnung 1—3), weil, wie wir sahen, saure Reaktion für die Diatomeen ungünstig ist und sich stärker auswirkt als der Wassergehalt des Bodens.

Es folgten als nächstindividuenreiches Substrat die kultivierten Böden. In 50% der Wiesenbodenproben zeigte sich eine üppige Diatomeenflora. Nur in knapp 13% der Wiesenböden fehlten Diatomeen; die Zahl der diatomeenlosen Ackerböden war sogar etwas geringer, starke Besiedlung war mit 31% aber wesentlich niedriger als bei den Wiesen (50%).

Über die unkultivierten Böden, die meistens mittel bis schwach besiedelt waren (72%) und nur zu 8% unbesiedelte Beispiele brachten (wie die Äcker), sinkt die Kurve der stark bewachsenen Erdproben mit 20% bis auf knapp 10% bei den Laubwäldern. Hier war aber fehlende Diatomeenflora schon viel häufiger, nämlich in 43% der Proben, und in Nadelwäldern war dies sogar in über 80% der Fall, der Rest war diatomeenarm. Sehr individuenreiche Böden wurden im Nadelwald überhaupt nicht angetroffen.

Die Ergebnisse der Agarkulturen zeigten keine grundsätzlichen Unterschiede. Jedoch war aus dem bereits erörterten Grunde wieder die Zahl der individuenreichen Böden bei allen Gruppen höher.

B. Die Diatomeenflora der Böden.

1. Formenzahl und -häufigkeit.

In den 167 Proben (s. Tabelle I) fanden sich insgesamt 114 Formen, die sich auf 100 Arten aus 24 Gattungen verteilten. Mit Ausnahme einer *Centralen* (*Cyclotella*) gehörten alle zu den *Pennalen*. Der größte Teil besaß eine Raphe, nur 11,7% waren rapheles.

Von ihnen traten 14 (*Tabellaria fenestrata*, *Meridion circulare* var. *constricta*, *Fragilaria capucina*, *Eunotia pectinalis*, *Eun. pect.* var. *minor*, *Eun. praeurupta* var. *inflata*, *Navicula Clementitis*, *Nav. dicephala*, *Nav. hungarica* var. *capitata*, *Nav. mutica* var. *binodis*, *Nav. radiosa*, *Nav. seminulum*, *Pinnularia interrupta*, *Nitzschia communis*) nur in Flüssigkeitskultur, 20 (*Cyclotella Meneghiniana*, *Eunotia lunaris*, *Cocconeis placentula*, *Stauroneis phoenicenteron*, *Navicula fragilarioides*, *Nav. graciloides*, *Nav. Hambergi*, *Nav. incompta*, *Nav. Lagerstedti* var. *palustris*, *Nav. muraliformis*, *Nav. perpusilla*, *Nav. söhrensens*, *Nav. tantula*, *Pinnularia lata*, *Pinn. leptosoma*, *Pinn. mesolepta*, *Pinn. microstauron* var. *Brebissonii*, *Epithemia zebra* var. *porcellus*, *Nitzschia parvula*, *Nitz. vitrea* var. *salinarum*) nur auf den Agarplatten auf. Zur sicheren Erfassung aller Arten ist es also günstig, sowohl Agar- wie Flüssigkeitskulturen anzusetzen.

Tabelle I. Die aus den 167 Erdproben isolierten Arten.

<i>Cyclotella Meneghiniana</i> Kütz.	<i>Meridion circulare</i> Ag.
<i>Tabellaria fenestrata</i> (Lyngb.) Kütz.	<i>Meridion circulare</i> var. <i>constricta</i>
<i>Tabellaria flocculosa</i> (Roth) Kütz.	(Ralfs) v. Heurck.
<i>Diatoma vulgare</i> Bory.	<i>Fragilaria capucina</i> Desm.

- Eunotia exigua* (Breb.) Grun.
Eunotia lunaris (Ehr.) Grun.
Eunotia pectinalis Kütz.
Eunotia pectinalis var. *minor*
 (Kütz.) Rabh.
Eunotia praerupta var. *inflata* Ehr.
Eunotia tenella (Grun.) Hust.
Cocconeis pediculus Ehr.
Cocconeis placentula Ehr.
Achnanthes coarctata Bréb.
Achnanthes lanceolata Bréb.
Achnanthes minutissima Kütz.
Rhoicosphenia curvata.
Frustulia rhomboides var. *saxonica*
 (Rabh.) d. Toni
Frustulia vulgaris Thwaites
Gyrosigma acuminatum
 (Kütz.) Rabh.
Caloneis silicula var. *truncatula*
 Grun.
Diploneis ovalis (Hilse) Cleve
Stauroneis anceps Ehr.
Stauroneis montana Krasske
Stauroneis montana var. *lanceolata*
 Hust.
Stauroneis phoenicenteron Ehr.
Stauroneis Smithii Grun.
Navicula atomus (Naeg.) Grun.
Navicula bacillum Ehr.
Navicula brekkaensis Petersen
Navicula caduca Hust.
Navicula cineta var. *Heufleri* Grun.
Navicula Clementis Grun.
Navicula contenta Grun.
Navicula contenta f. *biceps* Arnott.
Navicula cryptocephala Kütz.
Navicula dicephala (Ehr.) W. Smith
Navicula excelsa Krasske
Navicula exilissima Grun.
Navicula fossalis Krasske
Navicula fragilarioides Krasske
Navicula gibbula Lagerst.
Navicula graciloides A. Mayer.
Navicula Hambergi Hust.
Navicula Harderi nov. spec.
Navicula hungarica var. *capitata*
 Hust.
Navicula incompta Krasske
Navicula insociabilis Krasske
Navicula Lagerstedti Cleve
Navicula Lagerstedti var. *palustris*
 Hust.
Navicula minima Grun.
Navicula muraliformis nov. spec.
Navicula mutica Kütz.
Navicula mutica var. *binodis* Hust.
Navicula mutica var. *Cohnii*
 (Hilse) Grun.
Navicula mutica var. *nivalis*
 (Ehr.) Hust.
Navicula mutica var. *ventricosa*
 (Kütz.) Cleve
Navicula pelliculosa (Bréb.) Hilse
Navicula perpusilla Grun.
Navicula pygmaea Kütz.
Navicula radiosa Kütz.
Navicula seminulum Grun.
Navicula simplex Krasske
Navicula söhrensens Krasske
Navicula subseminulum nov. spec.
Navicula tantula Hust.
Pinnularia borealis Ehr.
Pinnularia fasciata Lagerst.
Pinnularia interrupta W. Smith
Pinnularia irrorata (Grun.) Hust.
Pinnularia lata (Bréb.) W. Smith.
Pinnularia leptosoma Grun.
Pinnularia mesolepta
 (Ehr.) W. Smith
Pinnularia microstauron (Ehr.) Cleve
Pinnularia microstauron var.
Brébissonii (Kütz.) Hust.
Pinnularia microstauron f. *diminuata*
 Grun.
Pinnularia molaris Grun.
Pinnularia obscura Krasske
Pinnularia subcapitata Gregory
Pinnularia subcapitata var. *Hilseana*
 (Janisch) Müller
Pinnularia viridis (Nitzsch.) Ehr.
Amphora montana Krasske
Amphora Normani Rabh.
Amphora ovalis Kütz.
Amphora ovalis var. *pediculus* Kütz.

<i>Cymbella naviculiformis</i> Auerswald	<i>Nitzschia communis</i> Rabh.
<i>Cymbella perpusilla</i> Cleve	<i>Nitzschia debilis</i> (Arnott) Grun.
<i>Gomphonema angustatum</i> (Kütz.) Rabh.	<i>Nitzschia frustulum</i> (Kütz.) Grun.
<i>Gomphonema angustatum</i> var. <i>linearis</i> Hust.	<i>Nitzschia Harderi</i> nov. spec.
<i>Gomphonema longiceps</i> var. <i>montana</i> (Schum.) Cleve	<i>Nitzschia interrupta</i> (Reich) Hust.
<i>Gomphonema parvulum</i> (Kütz.) Grün.	<i>Nitzschia hungarica</i> Grun.
<i>Epithemia sorex</i> Kütz.	<i>Nitzschia linearis</i> W. Smith
<i>Epithemia zebra</i> var. <i>porcellus</i> (Kütz.) Grun.	<i>Nitzschia obtusangula</i> nov. spec.
<i>Rhopalodia gibberula</i> (Ehr.) O. Müller	<i>Nitzschia palea</i> Kütz
<i>Hantzschia amphioxys</i> (Ehr.) Grun.	<i>Nitzschia parvula</i> Lewis
<i>Nitzschia amphibia</i> Grun.	<i>Nitzschia perminuta</i> Grun.
<i>Nitzschia atomus</i> nov. spec.	<i>Nitzschia stagnorum</i> Rabh.
	<i>Nitzschia vitrea</i> var. <i>salinarum</i> Norman
	<i>Surirella angustata</i> Kütz.
	<i>Surirella ovata</i> Kütz.

Die meisten Arten und Formen umfaßte die Gattung *Navicula*, nämlich 39 (34%); aber nur 20 von ihnen wurden auf Agar und in Flüssigkeit gemeinsam gefunden. In weitem Abstand folgten *Nitzschia* mit 15 und *Pinnularia* mit ebenfalls 15 Arten bzw. Formen. Die Artenzahlen der anderen 21 Gattungen lagen alle unter 10, die meisten unter 5.

Nach der großen Zahl von Arten war zu erwarten, daß *Navicula* die weiteste Verbreitung hätte und am häufigsten vorkäme. Das war aber überraschenderweise nicht der Fall, sondern sie wurde weit überflügelt von *Hantzschia*. Von *Hantzschia* trat zwar nur eine einzige Art (*amphioxys*) auf, die Form war aber ungemein häufig und wurde in 83 % der diatomeehaltigen Böden gefunden, so daß sie die weitaus häufigste Diatomee der deutschen Erden ist. *Navicula mutica* (Tab. VIII) mit einem Anteil an 42 % der diatomeehaltigen Böden hatte demgegenüber nur etwa die halbe Häufigkeit. Recht verbreitet (in rund $\frac{1}{3}$ der Böden) waren *Nitzschia palea*, *Pinnularia borealis*, *Navicula contenta* f. *biceps* und *Navicula mutica* var. *ventricosa*; 13 weitere Arten bzw. Formen kamen in 10—20 der Erden vor, der ganze Rest fand sich aber nur in weniger als 10 % der Böden, davon 40 in weniger als 1 %.

Bei dieser Feststellung der Häufigkeit der einzelnen Arten ist die Individuenzahl, in der sie in den Kulturen auftraten, nicht berücksichtigt. Manche Arten bildeten besonders in den Petrischalen mit Agar außerordentlich üppige Bestände, die in der Hauptsache daher rührten, daß eine große Zahl von Individuen in der Erdprobe vorhanden war, teils aber auch wohl daher, daß die betreffenden Arten sich auf dem Agar besonders gut vermehrten. Sie fielen dann bei der mikroskopischen Betrachtung der Präparate in jedem Blickfeld sofort ins Auge und übertrafen alle anderen Arten bei weitem, es sei denn, daß noch

andere Arten sich ebenfalls als solche „Massenform“ entwickelten. Am häufigsten als „Massenform“ trat *Nitzschia perminuta* auf. Sie war an sich durchaus nicht sehr häufig und wurde in nur 5,7% der Erden gefunden, aber in 80% ihres Gesamtvorkommens kam sie als Massenform vor. Auch *Navicula simplex* und *Achnanthes minutissima* traten zu 75% als Massenform auf. Ebenfalls in riesigen Mengen wurden dann *Nitzschia palea*, *Stauroneis montana* und besonders die winzigen, so schwer zu bestimmenden *Navicula*-Arten wie *Navicula caduca*, *N. fossilis*, *N. insociabilis*, *N. excelsa*, *N. minima* und *N. atomus* angetroffen. Viel weiter von der Spitzengruppe dieser Reihe entfernt stehen demgegenüber die *Navicula mutica*-Varietäten. Sie zeigten bei ihrem Vorkommen meist eine recht beträchtliche Individuenzahl, doch in der Regel nicht soviel, um sie als Massenform bezeichnen zu können. Auch die an Häufigkeit sonst alle überflügelnde *Hantzschia amphioxys* war meist in normaler Individuenzahl vertreten, nur zu 30% ihres Gesamtvorkommens als Massenform⁴.

Die Zahl der Arten, die gleichzeitig in den Kulturen auftraten, also die Artenzahl in den einzelnen Erdproben, war nicht besonders groß. Dabei ergaben Parallelansätze auf Agar weitgehend übereinstimmende Resultate. Da die Erde (ca. 50 ccm) durch das Sieben gut vermischte war, ist anzunehmen, daß alle darin enthaltenen Arten erfaßt wurden.

Unter den gesamten 167 Böden waren nur 3, aus denen aus den angesetzten Proben mehr als 20 Arten bzw. Formen herauskultiviert wurden, und mehr als 10 Diatomeenarten wurden nur in 23 Böden gefunden.

Durchschnittlich waren die Böden mit je 5,9 Formen besiedelt. Berücksichtigt man die Böden ohne Entwicklung bei der Berechnung nicht, so ergeben sich durchschnittlich 6,7 Formen je Boden.

2. Abhängigkeit der Formenzahl und -häufigkeit von verschiedenen Umweltbedingungen.

a) Bodenreaktion.

Der Einfluß der Bodenreaktion auf die Zahl der Individuen im ccm Erde ist bereits erörtert worden. In sauren Böden war die Entwicklung am schwächsten, sie stieg konstant, bis sie im alkalischen Bereich ihren Höhepunkt fand. Man könnte daraus vielleicht folgern wollen, daß auch die Anzahl der Arten auf alkalischem Substrat immer größer wäre als auf saurem. So einfach ist es aber nicht. Es gibt sowohl alkalische wie saure Böden mit viel und mit wenig Arten. So wurden z. B. gefunden bei pH 8,1 5 Arten, 7,7 8 Arten, 7,6 10 Arten, 7,2 5 Arten, 7,1 4 Arten und bei pH 5,7 1 Art, 5,5 15 Arten, 5,4 6 Arten, 5,2 21 Arten, 4,7 8 Arten. Die Schwankungen waren also sehr stark,

⁴ In den unten folgenden Diatomeenlisten der einzelnen Standorte sind die Massenformen durch Fettdruck hervorgehoben.

und zwar weil außer dem pH noch andere Faktoren (Feuchtigkeit, Lichteinflüsse usw.) gleichzeitig wirksam sind. Im großen ganzen waren allerdings die alkalischen Böden artenreicher als die sauren, was aber erst bei Verarbeitung eines großen Materials deutlich wurde. In sauren Böden wurden zahlreiche Arten meistens dann gefunden, wenn sie gleichzeitig feucht waren.

Auch über die Artenzusammensetzung bekommt man aus Einzelproben zunächst kein klares Bild, da sie bei den verschiedenen Böden außerordentlich stark variiert. Nach Durchsicht einer gewissen Anzahl von Proben hat man aber herausgefunden, daß zweifellos gewisse Arten bevorzugt auf alkalischem, andere vorwiegend auf saurem Boden vorkommen. Das zeigt sich allerdings nicht immer so charakteristisch wie in Tabelle II, in der einige typische Artenlisten von alkalischen und sauren Böden zusammengestellt sind. Mit Ausnahme von *Pinnularia borealis*, die bei hohem und niedrigerem pH -Wert vorkommt, liegen in den beiden Reaktionsbereichen oberhalb 7,6 und unterhalb 5,7 ganz verschiedene Arten vor. In sehr vielen Fällen war das aber weit weniger ausgeprägt, die meisten Arten vermögen nämlich innerhalb eines ziemlich breiten pH -Bereichs zu leben. Einen guten Einblick in die pH -Ansprüche der häufigsten Erddiatomeen gibt Abbildung 3. In ihr ist die Häufigkeit des Vorkommens der einzelnen Arten und Varietäten in den vier Erdboden- pH -Bereichen 8,1—7,0, 6,9—6,0, 5,9—5,0 und 4,9—3,7 dargestellt und zwar in Prozent des Gesamtvorkommens der betreffenden Art. Mit Ausnahme von *Pinnularia viridis*, *Pinnularia irrorata* und *Eunotia tenella* vermögen sich sämtliche angeführten Arten bei der Reaktion 6,9—6,0 zu entwickeln. In Erden dieser Reaktion kommt also die größte Artenzahl vor. Bei pH 8,1—7,0 gediehen nur 25 (von 34), bei pH 5,9—5,0 nur 24 und bei pH 4,9—3,7 nur 8 Arten.

Die Diatomeen sind in der Abbildung in der Reihenfolge ihrer Häufigkeit in alkalischen Böden geordnet. An der Spitze steht *Achnanthes coarctata*, die sowohl in alkalischen wie in schwach sauren Böden gleich häufig vorkam. Ebenso häufig in alkalischen Böden war *Navicula cincta* var. *Heufleri* zu finden, doch kam sie außer bei pH 6,9—6,0 auch noch bei pH 5,9—5,0 vor. Wieder nur in alkalischen bis schwach sauren Erdproben erschienen die folgenden *Navicula*-Arten, die *Navicula mutica*-Varietäten und *Amphora montana*. *Navicula mutica* selbst fand sich ganz selten auch in Böden von pH 5,9—5,0, *Achnanthes minutissima* auch in solchen von stark saurer Reaktion (4,9—3,7). *Hantzschia amphioxys* besiedelte fast 90 % der untersuchten alkalischen Böden. Daß trotzdem die Prozentzahl ihres Vorkommens in schwach sauren Böden (pH 6,9—6,0) so groß war, liegt daran, daß die Böden mit dieser Reaktion ja auch am häufigsten waren. Wären mehr alkalische Böden untersucht worden, so stiege auch die Prozentzahl. Diese Diatomee bietet ein schönes Beispiel dafür, wie die Individuenzahl im alkalischen Bereich steigt; über die Hälfte ihres Vorkommens als Massenform fiel nämlich in den Bereich der alkalischen Böden. Die nächsten Arten kamen bei einer Bodenreaktion von 8,1—5,0 vor, nicht jedoch in stark saurem Medium (pH 4,9—3,7). Eine Ausnahme bildeten *Navicula gibbula* und *Nitzschia debilis*, die sich nur in alkalischen bis schwach sauren Böden

Tabelle II. Typische Beispiele für die Artenzusammensetzung auf alkalischen und sauren Böden.

Boden Nr. :*)	1	2	3	4	5	6
pH:	8,1	7,7	7,6	5,7	5,4	4,7
<i>Achnanthes coarctata</i>		+				
<i>Achnanthes lanceolata</i>			+			
<i>Navicula caduca</i>	+		+			
<i>Navicula cincta</i> var. <i>Heufleri</i>			+			
<i>Navicula excelsa</i>		+				
<i>Navicula gibbula</i>		+				
<i>Navicula mutica</i>	+	+				
<i>Navicula seminulum</i>			+			
<i>Surirella ovata</i>		+	+			
<i>Amphora montana</i>			+			
<i>Hantzschia amphioxys</i>	+	+	+			
<i>Nitzschia palea</i>			+			
<i>Nitzschia Harderi</i>			+			
<i>Stauroneis montana</i> var. <i>lanceolata</i>			+			
<i>Pinnularia borealis</i>	+	+				+
<i>Pinnularia irrorata</i>						+
<i>Pinnularia microstauron</i> var. <i>diminuata</i>				+		+
<i>Pinnularia subcapitata</i>					+	
<i>Pinnularia viridis</i>						+
<i>Navicula minima</i>				+		+
<i>Navicula simplex</i>				+		
<i>Eunotia exigua</i>						+
<i>Eunotia lunaria</i>				+		
<i>Eunotia pectinalis</i>						+
<i>Eunotia tenella</i>				+		+
<i>Tabellaria flocculosa</i>						+

*) Boden 1. Kreidegrube bei Lebbin, Insel Wollin; Bewuchs: *Sanddorn*; Osthang; pH 8,1 (Aq. dest.), 7,5 (KCl); September.

Boden 2. Kartoffelacker, Osthang bei Kalkofen, Insel Wollin; pH 7,7 (Aq. dest.), 7,2 (KCl); September.

Boden 3. Botanischer Garten Göttingen, neben einem Abort (ohne Spülung), schattig, feucht; pH 7,6 (Aq. dest.), 7,0 (KCl); September.

Boden 4. Meißner, 730 m, Basalt, Norden, „rauchende Löcher“, Bewuchs: üppiges *Polytrichum* und *Sphagnum*; pH 5,7 (Aq. dest.), 5,0 (KCl); Januar.

Boden 5. Botanischer Garten Göttingen, hinter einem Abort (ohne Spülung), schattig, feucht; pH 5,4 (Aq. dest.); September.

Boden 6. Erlenbruch („Urwald“) bei Wenzen am Hils, eingetrocknete Pfütze; Bewuchs: *Laub-* und *Lebermoose*, grüner *Algen*bezug, feucht; pH 4,7 (Aq. dest.) 3,6 (KCl); Mai.

(pH 8,1—6,0) zeigten. Die restlichen Formen fehlten im alkalischen Substrat. *Navicula insociabilis*, *N. brekkaensis* und *Stauroneis montana* (ihre Varietät *lanceolata* fand sich auch in alkalischen Böden) hatten ihre Hauptverbreitung bei pH 6,9—6,0, die übrigen waren in der Regel auf saure Orte beschränkt.

Hauptsächlich die Gattungen *Pinnularia*, *Eunotia* und auch *Frustulia* lieferten saure Standorte besiedelnde Formen. *Pinnularia borealis* und *P. obscura* kamen jedoch durchaus auch in alkalischen und schwach sauren Böden vor und entwickelten dort zum Teil Massenformen. Zu nennen sind

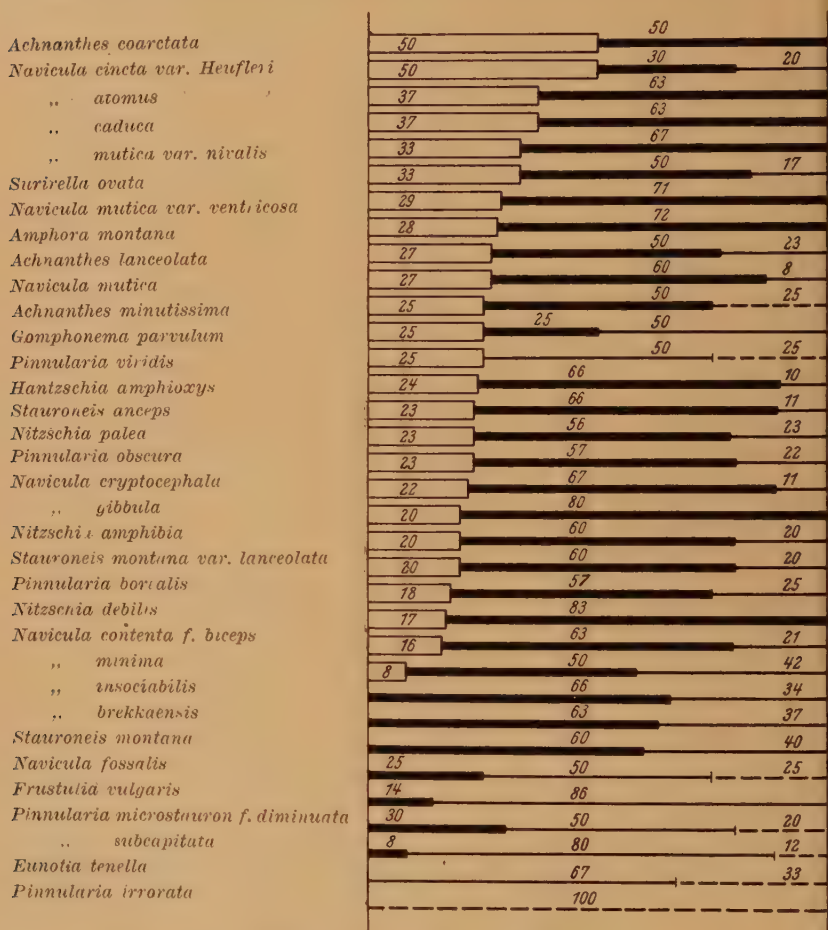


Abb. 3. Häufigkeit der einzelnen Diatomeen in den vier pH-Bereichen 8,1 bis 7,0 (breite weiße Säulen); 6,9—6,0 (schmale Säulen); 5,9 bis 5,0 (einfach ausgezogene Linien); 4,9 bis 3,7 (gestrichelte Linien) in Prozent ihres Gesamtvorkommens (Zahlen in bzw. über den Säulen od. Linien).

neben den in Abb. 3 aufgeführten säureliebenden Formen einige weitere, die nicht oft, doch dann nur auf saurem Substrat vorkamen, nämlich *Tabellaria fenestrata*, *T. flocculosa*, *Frustulia rhomboides* var. *savonica*, *Pinnularia subcapitata* var. *Hilseana*, *Eunotia pectinalis*, *Eu. erigua* und *Eu. lunaris*.

Daran, daß wenige der häufiger gefundenen Formen an stark sauren Standorten (pH 4,9—3,7) vorkamen, dazu an solchen mit einer Reaktion

von 5,9—5,0 auch nur selten, läßt sich die Artenarmut saurer Standorte erkennen. Da von verschiedenen Erdproben der pH -Wert nicht ermittelt wurde, konnte für einige Arten nicht angegeben werden, bei welchem pH sie sich hauptsächlich entwickelten: *Nitzschia Harderi* wurde häufiger im Botanischen Garten in Göttingen gefunden, dessen Erde im allgemeinen alkalisch reagiert; ebenso ist es mit *Nitzschia interrupta* und *Diploneis ovalis*. *Navicula Lagerstedti* und die Varietät *palustris* fanden sich nicht oft in den untersuchten Böden, doch dann nur in alkalischen, nur einmal in einem sehr stark sauren. Auch die Fundorte von *Amphora Normani* waren alkalisch bis schwach sauer.

Die günstige Wirkung, die Kalk auf das Diatomeenwachstum ausübt, ergibt sich aus folgendem Beispiel: In einem Buchenwald des Hils (Sandstein) bei Wenzen waren unter den alten Hochstämmen junge Buchen angepflanzt worden. Zur Herrichtung des Saatbeetes war der Rohhumus in Streifen bei Seite geräumt und der frei gelegte Untergrund mit Mergel (= kohlensaurer Kalk + Lehm) versetzt worden. In diesem Erdreich wuchsen die jungen Buchen. Zum Vergleich wurden sowohl der Rohhumuswall als auch die Erde des Pflanzbeetes untersucht (Mai). Schon die pH -Werte unterschieden sich deutlich: 1. Rohhumuswall: pH Aq. dest. 4,2, KCl 3,2; 2. Saatbeet: pH Aq. dest. 5,5, KCl 4,6. In den Ansätzen von 1. fand sich als charakteristische Form saurer Böden allein *Pinnularia irrorata* (Entwicklung bis Verdünnung 1); in 2. dagegen war die Diatomeenflora reichhaltig (Diatomeenbewuchs bis Verdünnung 4) und bestand zum Teil aus solchen Formen, die sonst hauptsächlich auf alkalischen Böden gedeihen:

Hantzschia amphioxys, *Navicula caduca*⁵, *Navicula cincta* var. *Heufleri*, *Navicula cryptocephala*, *Navicula insociabilis*, *Navicula mutica*, *Nitzschia palea*, *Pinnularia microstauron*, *Pinnularia obscura*, *Pinnularia subcapitata*, *Stauroneis montana* var. *lanceolata*.

In dieser Probe trat noch etwas anderes besonders klar hervor: daß Erddiatomeen oft wesentlich kleiner sind als in Bestimmungsbüchern für Diatomeen der Gewässer angegeben wird. Hier tauchte *Pinnularia obscura* als Massenform in winzigen Individuen von $13,6 \times 3,4 \mu$ auf; sie wiesen auch nur 5 Transapikalstreifen auf.

b) Andere Standortseinflüsse.

aa) Wasserreiche Standorte.

Wie nicht anders zu erwarten, sind wasserreiche Standorte wie Ufer, Grabenränder, Tümpel usw. nicht nur sehr individuenreich (siehe oben), sondern sie enthalten auch sehr viele Arten. So kamen im Uferschlamm der Leine bei Göttingen bei pH 6,0 im August folgende Diatomeen vor:

1. *Hantzschia amphioxys*
2. *Navicula cryptocephala*
3. *Navicula minima*
4. *Navicula simplex*
5. *Nitzschia amphibia*
6. *Nitzschia hungarica*

⁵ Fettdruck besagt, daß die Art als Massenform vorlag.

7. *Nitzschia palea*
8. *Pinnularia mesolepta*
9. *Pinnularia microstauron* var. *Brebbissonii*
10. *Gomphonema angustatum*
11. *Gomphonema parvulum*
12. *Amphora montana*
13. *Amphora ovalis*
14. *Surirella angustata*
15. *Cocconeis pediculus*
16. *Rhoicosphenia curvata*
17. *Gyrosigma acuminatum*
18. *Meridion circulare*
19. *Diatoma vulgare*
20. *Cyclotella Meneghiniana*

An anderen Stellen konnten aber ganz andere Arten vorhanden sein. Das hängt vom pH und anderen Faktoren ab.

Aus allen Untersuchungen zusammen ergibt sich die in Tabelle III wiedergegebene Anordnung, die sowohl über die an nassen Stellen vorkommenden Arten wie auch über deren relative Häufigkeit unterrichtet. 84 Formen wurden hier gefunden, d. h. fast $\frac{3}{4}$ der Gesamtzahl. Viele von ihnen kamen aber nur in 1 oder 2 Erdproben vor (darunter *Cyclotella*, die einzige *Centrale*), 25 waren häufiger. Am verbreitetsten war *Nitzschia palea*, die in mehr als der Hälfte der Böden vorkam. *Hantzschia amphioxys*, die an sich häufigste deutsche Erddiatomee, steht dagegen erst an siebter Stelle.

Tabelle III. Wasserreiche Standorte (Ufer, Grabenränder, Tümpel usw.), Vorkommen in % der Böden.

		%
1.	<i>Nitzschia palea</i>	54,2
2.	<i>Pinnularia subcapitata</i>	41,6
3.	<i>Navicula cryptocephala</i>	37,5
4.	<i>Pinnularia microstauron</i> f. <i>diminuata</i>	37,5
5.	<i>Achnanthes lanceolata</i>	37,5
6.	<i>Frustulia vulgaris</i>	33,3
7.	<i>Hantzschia amphioxys</i>	33,3
8.	<i>Navicula simplex</i>	29,2
9.	<i>Navicula minima</i>	25,0
10.	<i>Pinnularia viridis</i>	25,0
11.	<i>Eunotia tenella</i>	25,0
12.	<i>Amphora montana</i>	25,0
13.	<i>Nitzschia amphibia</i>	20,8
14.	<i>Pinnularia fasciata</i>	20,8
15.	<i>Gomphonema parvulum</i>	20,8
16.	<i>Eunotia lunaris</i>	20,8

Tabelle III. (Fortsetzung.)

		%
17.	<i>Navicula cincta</i> var. <i>Heufleri</i>	16,6
18.	<i>Eunotia exigua</i>	16,6
19.	<i>Achnanthes minutissima</i>	16,6
20.	<i>Nitzschia debilis</i>	12,5
21.	<i>Nitzschia linearis</i>	12,5
22.	<i>Pinnularia microstauron</i>	12,5
23.	<i>Surirella angustata</i>	12,5
24.	<i>Diploneis ovalis</i>	12,5
25.	<i>Meridion circulare</i>	12,5
26.	<i>Navicula contenta</i> f. <i>biceps</i>	8,3
27.	<i>Navicula insociabilis</i>	8,3
28.	<i>Navicula mutica</i>	8,3
29.	<i>Nitzschia Harderi</i> nov. spec.	8,3
30.	<i>Nitzschia interrupta</i>	8,3
31.	<i>Nitzschia perminuta</i>	8,3
32.	<i>Pinnularia mesolepta</i>	8,3
33.	<i>Pinnularia molaris</i>	8,3
34.	<i>Pinnularia obscura</i>	8,3
35.	<i>Stauroneis montana</i>	8,3
36.	<i>Stauroneis montana</i> var. <i>lanceolata</i>	8,3
37.	<i>Stauroneis Smithii</i>	8,3
38.	<i>Gomphonema angustatum</i>	8,3
39.	<i>Amphora Normani</i>	8,3
40.	<i>Amphora ovalis</i>	8,3
41.	<i>Surirella ovata</i>	8,3
42.	<i>Tabellaria flocculosa</i>	8,3
43.	<i>Caloneis silicula</i> var. <i>truncatula</i>	8,3
44.	<i>Gyrosigma acuminatum</i>	8,3
45.	<i>Navicula atomus</i>	4,2
46.	<i>Navicula bacillum</i>	4,2
47.	<i>Navicula Clementis</i>	4,2
48.	<i>Navicula fossalis</i>	4,2
49.	<i>Navicula graciloides</i>	4,2
50.	<i>Navicula hungarica</i> var. <i>capitata</i>	4,2
51.	<i>Navicula incompta</i>	4,2
52.	<i>Navicula mutica</i> var. <i>Cohnii</i>	4,2
53.	<i>Navicula mutica</i> var. <i>ivalis</i>	4,2
54.	<i>Navicula mutica</i> var. <i>ventricosa</i>	4,2
55.	<i>Navicula pygmaea</i>	4,2
56.	<i>Navicula radiosa</i>	4,2
57.	<i>Navicula söhrensens</i>	4,2
58.	<i>Navicula subseminulum</i> nov. spec.	4,2
59.	<i>Nitzschia atomus</i> nov. spec.	4,2
60.	<i>Nitzschia communis</i>	4,2

Tabelle III. (Fortsetzung.)

		%
61.	<i>Nitzschia frustulum</i>	4,2
62.	<i>Nitzschia hungarica</i>	4,2
63.	<i>Nitzschia stagnorum</i>	4,2
64.	<i>Pinnularia irrorata</i>	4,2
65.	<i>Pinnularia microstauron</i> var. <i>Brébissonii</i>	4,2
66.	<i>Pinnularia leptosoma</i>	4,2
67.	<i>Pinnularia subcapitata</i> var. <i>Hilseana</i>	4,2
68.	<i>Stauroneis anceps</i>	4,2
69.	<i>Stauroneis phoenicenteron</i>	4,2
70.	<i>Gomphonema angustatum</i> var. <i>linearis</i>	4,2
71.	<i>Gomphonema longiceps</i> var. <i>montana</i>	4,2
72.	<i>Amphora ovalis</i> var. <i>pediculus</i>	4,2
73.	<i>Eunotia pectinalis</i>	4,2
74.	<i>Achnanthes coarctata</i>	4,2
75.	<i>Epithemia zebra</i> var. <i>porcellus</i>	4,2
76.	<i>Epithemia sorex</i>	4,2
77.	<i>Cocconeis pediculus</i>	4,2
78.	<i>Cymbella naviculiformis</i>	4,2
79.	<i>Cymbella perpusilla</i>	4,2
80.	<i>Rhopalodia gibberula</i>	4,2
81.	<i>Rhoicosphenia curvata</i>	4,2
82.	<i>Diatoma vulgare</i>	4,2
83.	<i>Fragilaria capucina</i>	4,2
84.	<i>Cyclotella Meneghiniana</i>	4,2

Daß es auch Ausnahmen von der Regel gibt, und nicht jeder wasser-nahe Erdboden die für wasserreiche Standorte charakteristische Diatomeenflora besitzen muß, zeigte das Ufer des Vietziger Sees bei Kalkofen, Insel Wollin, von alkalischer Reaktion (pH Aq. dest. 7,8, KCl 7,1; September):

Hantzschia amphioxys, *Navicula atomus*, *Navicula contenta* f. *biceps*, *Navicula mutica*, *Nitzschia palea*, *Nitzschia debilis*, *Nitzschia linearis*, *Pinnularia obscura*, *Achnanthes coarctata*.

Die meisten der hier vorkommenden Arten waren sonst in der Regel an relativ trockenen Standorten zu treffen. Die Abweichungen hängen wahrscheinlich damit zusammen, daß die Entfernung, auf die ein Gewässer noch Einfluß auf das umliegende Gelände ausübt, recht verschieden sein kann. Hier scheint sie sehr gering gewesen zu sein. Erstaunlich artenarm war auch das Ufer der Salzach (pH 6,7; Mai), wo nur *Hantzschia amphioxys* und *Achnanthes minutissima* (diese massenhaft) vorkamen, obgleich das Wasser hier sicher täglich herüberschwemmte. Auch in Würzburg, am Ufer des Mains, Südwesthang, war keine sehr üppige Diatomeenbesiedlung festzustellen (pH Aq. dest. 7,2, KCl 6,9; Mai). Es fanden sich:

Hantzschia amphioxys, *Navicula atomus*, *Navicula mutica*, *Navicula mutica* var. *Colnii*, *Navicula mutica* var. *nivalis*, *Navicula simplex*.

Vielleicht führte das Wasser der Salzach und des Mains schädliche Stoffe mit sich? Vielleicht lag ein Grund beim Salzach-Ufer auch in der Beschaffenheit des Bodens. Er bestand aus hellem quarzhaltigem Sand, und es wäre denkbar, daß dieser für Diatomeenwachstum ungeeignet ist. Das ist deshalb nicht ganz unwahrscheinlich, weil auch in den sehr sandigen — sowohl kultivierten als auch unkultivierten — Böden aus der sog. „Zielow“ bei Warnow, Insel Wollin, Kieselalgen völlig fehlten. Auch andere Algen und Organismen waren in diesen Ansätzen kaum zu bemerken. Untersuchungen des Ostseestrandes bei Misdroy ergaben ähnliche Ergebnisse. Auch hier fehlten Diatomeen sowohl im feuchten vom Meerwasser überspülten Strandsand als auch im trockenen der Dünen. Lediglich einmal zeigte sich in einem Reagenzglas, in dem Sand von einer ständig überfluteten Sandbank angesetzt war, *Navicula Clementis*. Hier mag das negative Ergebnis aber auch daran liegen, daß in unseren Kultursubstraten Süßwasser verwendet wurde; es ist möglich, daß Diatomeen, die an Meerwasser gewöhnt sind, in solchen Nährlösungen nicht leben können.

bb) Trockenere Böden.

Trockene Böden waren ganz allgemein artenärmer als feuchte. Besonders große Diatomeenarmut lag bei Kombination von Trockenheit mit saurem Boden vor. Das zeigte eine Erdprobe, die aus einer sauren (pH 4,6; Juni) und dazu noch trockenen Moortasche bei Bad Elster stammte: In dem Moor, das für die Bäder gebraucht worden war und dann zwei Jahre lang gelagert hatte, fand sich als einzige Art in Massen *Pinnularia microstauron* f. *diminuata*.

Aber auch trockene Böden alkalischer oder sehr schwach saurer Reaktion waren formenarm. Oft kam nur *Hantzschia amphioxys* als ausdauerndste Diatomee in ihnen vor, teilweise massenhaft, z. B. in einem hohen steilen unbewachsenen Südhang an der Salzach (pH Aq. dest. 7,0, KCl 6,7; Mai). Gesellten sich noch einige Formen dazu, so waren es meist diejenigen, die in den folgenden Bodenproben gefunden wurden:

Aufschluß, steiler Südhang, Muschelkalk, Nikolausberg bei Göttingen (pH Aq. dest. 6,9; April):

Hantzschia amphioxys, *Navicula atomus*, *N. mutica*, *N. mutica* var. *nivalis*, *N. mutica* var. *ventricosa*.

Oder:

Austrocknende Regenrinne am Balkon des Botanischen Instituts in Göttingen, Westen (pH Aq. dest. 6,7; März):

Hantzschia amphioxys, *Navicula contenta* f. *biceps*, *N. mutica* var. *ventricosa*, *Pinnularia borealis*.

Diese Diatomeen waren aber nicht ausschließlich Bewohner trockener Standorte, sondern sie fanden sich auch an feuchten (vgl. Tab. III); dort treten sie aber nur selten auf.

Aus der Gesamtzahl unserer Untersuchungen kann man die Bodendiatomeen hinsichtlich ihrer Feuchtigkeitsansprüche in 3 Gruppen einteilen:

1. Gruppe: Nur oder vorwiegend an nassen Standorten nahe einem Gewässer.

- | | |
|---|--|
| 1. <i>Navicula bacillum</i> | 32. <i>Gomphonema angustatum</i> |
| 2. <i>Navicula Clementis</i> | 33. <i>Gomphonema angustatum</i>
var. <i>linearis</i> |
| 3. <i>Navicula dicephala</i> | 34. <i>Gomphonema longiceps</i>
var. <i>montana</i> |
| 4. <i>Navicula graciloides</i> | 35. <i>Gomphonema parvulum</i> |
| 5. <i>Navicula hungarica</i> var. <i>capitata</i> | 36. <i>Amphora Normani</i> |
| 6. <i>Navicula incompta</i> | 37. <i>Amphora ovalis</i> |
| 7. <i>Navicula pygmaea</i> | 38. <i>Amphora ovalis</i> var. <i>pediculus</i> |
| 8. <i>Navicula radiosa</i> | 39. <i>Eunotia exigua</i> |
| 9. <i>Navicula seminulum</i> | 40. <i>Eunotia lunaris</i> |
| 10. <i>Navicula simplex</i> | 41. <i>Eunotia pectinalis</i> |
| 11. <i>Navicula söhrensens</i> | 42. <i>Eunotia pectinalis</i> var. <i>minor</i> |
| 12. <i>Nitzschia amphibia</i> | 43. <i>Eunotia praerupta</i> var. <i>inflata</i> |
| 13. <i>Nitzschia atomus</i> nov. spec. | 44. <i>Eunotia tenella</i> |
| 14. <i>Nitzschia frustulum</i> | 45. <i>Frustulia vulgaris</i> |
| 15. <i>Nitzschia hungarica</i> | 46. <i>Surirella angustata</i> |
| 16. <i>Nitzschia linearis</i> | 47. <i>Surirella ovata</i> |
| 17. <i>Nitzschia obtusangula</i> nov. spec. | 48. <i>Epithemia sorex</i> |
| 18. <i>Nitzschia parvula</i> | 49. <i>Epithemia zebra</i> var. <i>porcellus</i> |
| 19. <i>Nitzschia perminuta</i> | 50. <i>Cocconeis pediculus</i> |
| 20. <i>Nitzschia stagnorum</i> | 51. <i>Cymbella naviculiformis</i> |
| 21. <i>Pinnularia lata</i> | 52. <i>Cymbella perpupilla</i> |
| 22. <i>Pinnularia leptosoma</i> | 53. <i>Diploneis ovalis</i> |
| 23. <i>Pinnularia mesolepta</i> | 54. <i>Caloneis silicula</i> var. <i>truncatula</i> |
| 24. <i>Pinnularia microstauron</i> | 55. <i>Tabellaria fenestrata</i> |
| 25. <i>Pinnularia microstauron</i>
var. <i>Brébissonii</i> | 56. <i>Tabellaria flocculosa</i> |
| 26. <i>Pinnularia microstauron</i>
f. <i>diminuata</i> | 57. <i>Meridion circulare</i> |
| 27. <i>Pinnularia subcapitata</i> | 58. <i>Meridion circulare</i> var. <i>constricta</i> |
| 28. <i>Pinnularia subcapitata</i>
var. <i>Hilseana</i> | 59. <i>Rhoicosphenia curvata</i> |
| 29. <i>Pinnularia viridis</i> | 60. <i>Gyrosigma acuminatum</i> |
| 30. <i>Stauroneis phoenicenteron</i> | 61. <i>Diatoma vulgare</i> |
| 31. <i>Stauroneis Smithii</i> | 62. <i>Fragilaria capucina</i> |
| | 63. <i>Cyclotella Meneghiniana</i> |

2. Gruppe: Indifferente Arten.

- | | |
|----------------------------------|-----------------------------------|
| 1. <i>Navicula cryptocephala</i> | 7. <i>Pinnularia molaris</i> |
| 2. <i>Nitzschia communis</i> | 8. <i>Amphora montana</i> |
| 3. <i>Nitzschia debilis</i> | 9. <i>Achnanthes lanceolata</i> |
| 4. <i>Nitzschia palea</i> | 10. <i>Achnanthes minutissima</i> |
| 5. <i>Pinnularia fasciata</i> | 11. <i>Cocconeis placentula</i> |
| 6. <i>Pinnularia irrorata</i> | |

3. Gruppe: Selten oder nie auf nassem Substrat (nahe einem Gewässer).

- | | |
|--|---|
| 1. <i>Navicula atomus</i> | 21. <i>Navicula mutica</i> var. <i>Cohnii</i> |
| 2. <i>Navicula brekkaensis</i> | 22. <i>Navicula mutica</i> var. <i>nivalis</i> |
| 3. <i>Navicula caduca</i> | 23. <i>Navicula mutica</i> var. <i>ventricosa</i> |
| 4. <i>Navicula cincta</i> var. <i>Heufleri</i> | 24. <i>Navicula pelliculosa</i> |
| 5. <i>Navicula contenta</i> | 25. <i>Navicula perpusilla</i> |
| 6. <i>Navicula contenta</i> f. <i>biceps</i> | 26. <i>Navicula subseminulum</i> nov. spec. |
| 7. <i>Navicula excelsa</i> | 27. <i>Navicula tantula</i> |
| 8. <i>Navicula exilissima</i> | 28. <i>Nitzschia Harderi</i> nov. spec. |
| 9. <i>Navicula fossalis</i> | 29. <i>Nitzschia interrupta</i> |
| 10. <i>Navicula fragilarioides</i> | 30. <i>Nitzschia vitrea</i> var. <i>salinarum</i> |
| 11. <i>Navicula gibbula</i> | 31. <i>Pinnularia borealis</i> |
| 12. <i>Navicula Hambergi</i> | 32. <i>Pinnularia interrupta</i> |
| 13. <i>Navicula Harderi</i> nov. spec. | 33. <i>Pinnularia obscura</i> |
| 14. <i>Navicula insociabilis</i> | 34. <i>Stauroneis anceps</i> |
| 15. <i>Navicula Lagerstedti</i> | 35. <i>Stauroneis montana</i> |
| 16. <i>Navicula Lagerstedti</i>
var. <i>palustris</i> | 36. <i>Stauroneis montana</i>
var. <i>lanceolata</i> |
| 17. <i>Navicula minima</i> | 37. <i>Achnanthes coarctata</i> |
| 18. <i>Navicula muraliformis</i> nov. spec. | 38. <i>Frustulia rhomboides</i> var. <i>saxonica</i> |
| 19. <i>Navicula mutica</i> | 39. <i>Hantzschia amphioxys</i> |
| 20. <i>Navicula mutica</i> var. <i>binodis</i> | 40. <i>Rhopalodia gibberula</i> |

Man sieht, daß die Gruppe 1 den größten Teil der Formen und besonders Gattungen umfaßt. Von den Hauptgattungen sind hier *Nitzschia* und *Pinnularia* mit den meisten ihrer Arten vertreten, während die größte Zahl der *Navicula*-Arten in Gruppe 3 anzutreffen ist. An häufigen Formen der trockeneren Standorte sind noch zu nennen *Hantzschia amphioxys*, *Pinnularia borealis* und *P. obscura*; *Rhopalodia gibberula* gehört ebenfalls hierher.

Der Feuchtigkeitsgehalt des Bodens ist also zweifellos von Einfluß auf die Verteilung der Arten. Es gilt nun zu untersuchen, ob an den verschiedenen weniger nassen Standorten untereinander ebenfalls Unterschiede festzustellen sind; hinsichtlich des Individuenreichtums hatte sich oben ja ergeben, daß kultivierte Böden (Äcker, Wiesen) reicher besiedelt sind als unkultiviertes ruhendes Land (Wegböschungen, Feldwege, Halden).

a) Wiesen.

Eine Wiese an der Leine bei Göttingen (pH 6,0) enthielt im August *Hantzschia amphioxys*, *Navicula contenta* f. *biceps*, *N. insociabilis*, *N. mutica*, *N. mutica* var. *Cohnii*; und bei Wenzen am Hils (pH 6,9, Südhang, Bewuchs: Gras und Klee) ergab sich im Mai *Hantzschia amphioxys*, *Navicula contenta* f. *biceps*, *N. mutica*, *Pinnularia borealis*, *Stauroneis montana* var. *lanceolata*. Ähnlich war die Flora der meisten Wiesen zusammen-

gesetzt, wozu sich dann aber noch zahlreiche andere Arten gesellten, wenn die Wiesen nasser waren als die beiden eben erwähnten.

Insgesamt wurden 51 Arten bei der Durchmusterung der in den verschiedensten Teilen Deutschlands gelegenen Wiesen gefunden (Tab. IV). Fast die Hälfte aller überhaupt festgestellten Arten kam also auf Wiesen vor. Diese Zahl geht aber sehr stark zurück, wenn man einige besonders feuchte Wiesen wegläßt, die schon fast als wasserreiche Standorte gelten konnten; dann fallen nämlich fast alle am Ende der Tabelle aufgeführten Gattungen, nämlich *Gomphonema*, *Amphora*, *Surirella*, *Cymbella*, *Tabellaria*, *Meridion* und *Diatoma*, fort, und es bleiben nur neun übrig. Auch die Zahl der Arten und Formen wird dann um 21 verringert. Häufiger als zweimal wurden bei Wiesen nur 13 Arten angetroffen.

Tabelle IV. Wiesen. Vorkommen der Diatomeen in ‰ der Böden.

1.	<i>Hantzschia amphioxys</i>	76,9
2.	<i>Navicula mutica</i>	61,5
3.	<i>Navicula contenta</i> f. <i>biceps</i>	46,1
4.	<i>Nitzschia palea</i>	46,1
5.	<i>Pinnularia obscura</i>	38,4
6.	<i>Navicula atomus</i>	30,7
7.	<i>Navicula mutica</i> var. <i>ventricosa</i>	30,7
8.	<i>Stauroneis montana</i> var. <i>lanceolata</i>	30,7
9.	<i>Navicula cryptocephala</i>	23,0
10.	<i>Navicula insociabilis</i>	23,0
11.	<i>Navicula mutica</i> var. <i>nivalis</i>	23,0
12.	<i>Pinnularia borealis</i>	23,0
13.	<i>Pinnularia subcapitata</i>	23,0
14.	<i>Navicula cincta</i> var. <i>Heußleri</i>	15,3
15.	<i>Navicula minima</i>	15,3
16.	<i>Navicula mutica</i> var. <i>Cohnii</i>	15,3
17.	<i>Nitzschia debilis</i>	15,3
18.	<i>Nitzschia perminuta</i>	15,3
19.	<i>Stauroneis montana</i>	15,3
20.	<i>Achnanthes lanceolata</i>	15,3
21.	<i>Surirella angustata</i>	15,3
22.	<i>Navicula brekkaensis</i>	7,7
23.	<i>Navicula caduca</i>	7,7
24.	<i>Navicula dicephala</i>	7,7
25.	<i>Navicula fossalis</i>	7,7
26.	<i>Navicula gibbula</i>	7,7
27.	<i>Navicula pelliculosa</i>	7,7
28.	<i>Navicula muraliformis</i> nov. spec.	7,7
29.	<i>Nitzschia amphibia</i>	7,7
30.	<i>Nitzschia communis</i>	7,7
31.	<i>Nitzschia Harderi</i> nov. spec.	7,7

Tabelle IV. (Fortsetzung.)

32.	<i>Nitzschia obtusangula</i> nov. spec.	7,7
33.	<i>Nitzschia parvula</i>	7,7
34.	<i>Pinnularia lata</i>	7,7
35.	<i>Pinnularia microstauron</i>	7,7
36.	<i>Pinnularia molaris</i>	7,7
37.	<i>Stauroneis anceps</i>	7,7
38.	<i>Gomphonema angustatum</i>	7,7
39.	<i>Amphora montana</i>	7,7
40.	<i>Amphora ovalis</i>	7,7
41.	<i>Eunotia pectinalis</i> var. <i>minor</i>	7,7
42.	<i>Eunotia praeupta</i> var. <i>inflata</i>	7,7
43.	<i>Achnanthes minutissima</i>	7,7
44.	<i>Frustulia vulgaris</i>	7,7
45.	<i>Surirella ovata</i>	7,7
46.	<i>Cymbella naviculiformis</i>	7,7
47.	<i>Diploneis ovalis</i>	7,7
48.	<i>Tabellaria fenestrata</i>	7,7
49.	<i>Tabellaria flocculosa</i>	7,7
50.	<i>Meridion circulare</i> var. <i>constricta</i>	7,7
51.	<i>Diatoma vulgare</i>	7,7

β) Äcker.

Im allgemeinen enthielten die Äcker weniger Diatomeenarten als die Wiesen.

So kamen auf einem Kartoffelacker westlich Weende bei Göttingen (pH 6,1) im August nur *Hantzschia amphioxys*, *Navicula mutica*, *N. m.* var. *nivalis* und *Stauroneis montana* var. *lanceolata* vor, und ein Acker mit jungem Getreide am Nordhang des Steinbergs bei Würzburg oberhalb Dürrbachs (pH 6,3) zeigte im Juni nur *Hantzschia amphioxys*, *Navicula minima* und *N. mutica*. Ein junges Getreidefeld bei Burghausen/Salzach (pH 6,8) enthielt dagegen 8, ein Rübenfeld auf der Insel Wollin (pH 7,5) 7 Arten.

Tabelle V führt die Formen an, die in Äckern insgesamt gefunden wurden. Es sind nur 23 aus 7 Gattungen. Wie in der Gesamtheit der Böden, so war auch hier *Hantzschia amphioxys* die häufigste. Sie kam in 88,2% der Ackerbodenproben vor, wobei der eine diatomeenlose Boden bei der Berechnung unberücksichtigt blieb. Die nächst häufigen Arten bzw. Formen gehören der Gattung *Navicula* an; von ihnen besiedelten *Navicula mutica* und ihre Varietät *ventricosa* über die Hälfte der untersuchten Ackererden. Es folgen *Stauroneis anceps* und *Pinnularia borealis* aus fast 30% der Böden. 13 der Arten waren häufiger als zweimal in Äckern vorhanden (die 13 erstgenannten in Tab. V).

Tabelle V. *Äcker. Vorkommen der Diatomeen in % der Böden.*

1.	<i>Hantzschia amphioxys</i>	88,2
2.	<i>Navicula mutica</i> var. <i>ventricosa</i>	58,8
3.	<i>Navicula mutica</i>	52,9
4.	<i>Navicula atomus</i>	29,4
5.	<i>Navicula caduca</i>	29,4
6.	<i>Pinnularia borealis</i>	29,4
7.	<i>Stauroneis anceps</i>	29,4
8.	<i>Navicula excelsa</i>	17,6
9.	<i>Navicula mutica</i> var. <i>Cohnii</i>	17,6
10.	<i>Navicula mutica</i> var. <i>nivalis</i>	17,6
11.	<i>Nitzschia palea</i>	17,6
12.	<i>Stauroneis montana</i> var. <i>lanceolata</i>	17,6
13.	<i>Amphora montana</i>	17,6
14.	<i>Achnanthes coarctata</i>	11,7
15.	<i>Navicula cryptocephala</i>	5,8
16.	<i>Navicula fossalis</i>	5,8
17.	<i>Navicula gibbula</i>	5,8
18.	<i>Navicula minima</i>	5,8
19.	<i>Navicula pelliculosa</i>	5,8
20.	<i>Navicula simplex</i>	5,8
21.	<i>Pinnularia microstauron</i> f. <i>diminuata</i>	5,8
22.	<i>Pinnularia obscura</i>	5,8
23.	<i>Nitzschia communis</i>	5,8

γ) Ruhendes Land.

Wie zwischen Äckern und Wiesen, so gab es auch zwischen kultiviertem und unkultiviertem ruhenden Land keine grundsätzlichen Unterschiede in bezug auf die Diatomeenarten. Sowohl hinsichtlich der Zahl der Arten wie auch der Arten selbst traten bei den verschiedenen Standorten starke Differenzen auf; sie wurden vor allem durch die Bodenreaktion und den Feuchtigkeitsgehalt bedingt, insgesamt deckt sich die Liste in Tabelle VI, in der alle an Wegböschungen, Feldwegen, Halden, Rasen und ähnlichen Standorten gefundenen Arten zusammengestellt sind, aber mit den vorhergehenden Tabellen. Die Arten- und Formenzahl 46 ist recht hoch, an Gattungen fanden sich 11. Auch die Zahl der Arten, die häufiger als zweimal waren, ist relativ groß, nämlich 21.

Tabelle VI. *Ruhendes Land. Vorkommen der Diatomeen in % der Böden.*

1.	<i>Hantzschia amphioxys</i>	84,2
2.	<i>Navicula mutica</i>	60,5
3.	<i>Pinnularia borealis</i>	44,7
4.	<i>Navicula mutica</i> var. <i>nivalis</i>	36,8
5.	<i>Navicula atomus</i>	31,5
6.	<i>Navicula contenta</i> f. <i>biceps</i>	31,5

Tabelle VI. (Fortsetzung.)

7.	<i>Navicula mutica</i> var. <i>ventricosa</i>	31,5
8.	<i>Nitzschia palea</i>	23,6
9.	<i>Navicula caduca</i>	15,8
10.	<i>Navicula cincta</i> var. <i>Heufleri</i>	15,8
11.	<i>Navicula gibbula</i>	15,8
12.	<i>Navicula excelsa</i>	13,1
13.	<i>Pinnularia obscura</i>	13,1
14.	<i>Stauroneis anceps</i>	10,5
15.	<i>Amphora montana</i>	10,5
16.	<i>Navicula cryptocephala</i>	7,9
17.	<i>Navicula minima</i>	7,9
18.	<i>Nitzschia debilis</i>	7,9
19.	<i>Nitzschia Harderi</i> nov. spec.	7,9
20.	<i>Stauroneis montana</i> var. <i>lanceolata</i>	7,9
21.	<i>Achnanthes minutissima</i>	7,9
22.	<i>Navicula insociabilis</i>	5,2
23.	<i>Navicula Lagerstedti</i>	5,2
24.	<i>Nitzschia perminuta</i>	5,2
25.	<i>Pinnularia irrorata</i>	5,2
26.	<i>Pinnularia subcapitata</i>	5,2
27.	<i>Stauroneis montana</i>	5,2
28.	<i>Eunotia exigua</i>	5,2
29.	<i>Achnanthes coarctata</i>	5,2
30.	<i>Achnanthes lanceolata</i>	5,2
31.	<i>Frustulia rhomboides</i> var. <i>saxonica</i>	5,2
32.	<i>Navicula brekkaensis</i>	2,6
33.	<i>Navicula exilissima</i>	2,6
34.	<i>Navicula fossalis</i>	2,6
35.	<i>Navicula Hambergi</i>	2,6
36.	<i>Navicula mutica</i> var. <i>Cohnii</i>	2,6
37.	<i>Navicula pelliculosa</i>	2,6
38.	<i>Navicula perpusilla</i>	2,6
39.	<i>Nitzschia amphibia</i>	2,6
40.	<i>Nitzschia vitrea</i> var. <i>salinarum</i>	2,6
41.	<i>Pinnularia fasciata</i>	2,6
42.	<i>Pinnularia microstauron</i>	2,6
43.	<i>Pinnularia subcapitata</i> var. <i>Hilseana</i>	2,6
44.	<i>Surirella angustata</i>	2,6
45.	<i>Surirella ovata</i>	2,6
46.	<i>Epithemia sores</i>	2,6

δ) Wälder.

In Laubwäldern kamen 42 von den 114 überhaupt gefundenen Diatomeenformen, also 36,8%, vor; sie verteilen sich auf zehn Gat-

tungen. Tabelle VII bringt sie in der Reihenfolge ihrer Häufigkeit. Ein erheblicher Teil zeigte sich nur ein- oder zweimal. Einige Arten bzw. Formen darunter, nämlich *Navicula subseminulum* nov. spec., *N. Lagerstedti* var. *palustris*, *N. tantula*, *N. Harderi* und *N. mutica* var. *binodis*, wurden nur hier gefunden. Nur 15 Arten waren relativ häufig. An erster Stelle stand wieder *Hantzschia amphioxys*, die in 80 % der untersuchten Laubwaldböden auftrat. Recht häufig, in 55 % der Laubwälder, wurde *Navicula contenta* f. *biceps* angetroffen. Ebenfalls häufig, nämlich in 40 % der Laubwaldproben, waren *Pinnularia borealis* und *P. obscura*. *Navicula brekkaensis* kam im ganzen nicht oft vor, nämlich nur in 5,7 % aller 167 Böden, ein erstaunlich großer Teil ihrer Fundorte lag jedoch in Laubwäldern: 30 % derartiger Proben wurden von ihr besiedelt. Erst jetzt ist *Navicula mutica* zu nennen, während sie sonst neben *Hantzschia amphioxys* die häufigste Kieselalge war. Auch *Nitzschia palea* war gegenüber ihrer Gesamthäufigkeit — sie stand an dritter Stelle — in Laubwäldern relativ selten.

Tabelle VII. Laubwälder. Vorkommen der Diatomeen in % der Böden.

1.	<i>Hantzschia amphioxys</i>	80,0
2.	<i>Navicula contenta</i> f. <i>biceps</i>	55,0
3.	<i>Pinnularia borealis</i>	40,0
4.	<i>Pinnularia obscura</i>	40,0
5.	<i>Navicula brekkaensis</i>	30,0
6.	<i>Pinnularia subcapitata</i>	25,0
7.	<i>Navicula mutica</i>	20,0
8.	<i>Nitzschia debilis</i>	20,0
9.	<i>Nitzschia palea</i>	20,0
10.	<i>Navicula atomus</i>	15,0
11.	<i>Navicula cincta</i> var. <i>Heußleri</i>	15,0
12.	<i>Navicula gibbula</i>	15,0
13.	<i>Navicula insociabilis</i>	15,0
14.	<i>Navicula minima</i>	15,0
15.	<i>Stauroneis montana</i> var. <i>lanceolata</i>	15,0
16.	<i>Navicula caduca</i>	10,0
17.	<i>Navicula contenta</i>	10,0
18.	<i>Navicula cryptocephala</i>	10,0
19.	<i>Navicula fossalis</i>	10,0
20.	<i>Navicula Harderi</i> nov. spec.	10,0
21.	<i>Navicula mutica</i> var. <i>nivalis</i>	10,0
22.	<i>Navicula mutica</i> var. <i>ventricosa</i>	10,0
23.	<i>Navicula tantula</i>	10,0
24.	<i>Nitzschia amphibia</i>	10,0
25.	<i>Pinnularia microstauron</i> f. <i>diminuata</i>	10,0
26.	<i>Achnanthes lanceolata</i>	10,0
27.	<i>Navicula Lagerstedti</i> var. <i>palustris</i>	5,0

Tabelle VII. (Fortsetzung.)

28.	<i>Navicula mutica</i> var. <i>binodis</i>	5,0
29.	<i>Navicula perpusilla</i>	5,0
30.	<i>Navicula subseminulum</i> nov. spec.	5,0
31.	<i>Nitzschia frustulum</i>	5,0
32.	<i>Nitzschia Harderi</i> nov. spec.	5,0
33.	<i>Pinnularia irrorata</i>	5,0
34.	<i>Pinnularia microstauron</i> var. <i>Brébissonii</i>	5,0
35.	<i>Pinnularia viridis</i>	5,0
36.	<i>Stauroneis anceps</i>	5,0
37.	<i>Gomphonema parvulum</i>	5,0
38.	<i>Eunotia tenella</i>	5,0
39.	<i>Achnanthes coarctata</i>	5,0
40.	<i>Achnanthes minutissima</i>	5,0
41.	<i>Frustulia rhomboides</i> var. <i>saxonica</i>	5,0
42.	<i>Surirella ovata</i>	5,0

Bei den Laubwäldern war übrigens die Zusammensetzung der Diatomeenflora wieder sehr verschieden je nach der Beschaffenheit des Bodens. Nur dürrig war die Besiedlung in relativ sauren Böden (z. B. Nordhang des Meißner, 490 m, Sandstein; pH 5,6; Januar: *Pinnularia borealis* und *Pinn. subcapitata*). War die Reaktion dagegen nur schwach sauer, so war die Diatomeenflora üppiger (z. B. Buchenwald an der Salzach bei Burghausen; pH 6,8; Juni):

Hantzschia amphioxys, *Navicula fossalis*, *Nitzschia amphibia*, *Nitzschia Harderi*, *Nitzschia palea*, *Achnanthes minutissima*; ferner

Buchenwald am Südosthang des Hainbergs bei Göttingen:

Hantzschia amphioxys, *Navicula atomus*, *Navicula contenta* f. *biceps*, *Navicula cryptocephala*, *Navicula gibbula*, *Navicula mutica*, *Navicula mutica* var. *nivalis*, *Navicula mutica* var. *ventricosa*, *Nitzschia debilis*.

Trat zu günstiger Reaktion auch noch relativ große Feuchtigkeit, wie es z. B. bei einem Erlenbestand am Nordhang des Hohen Hagen bei Dransfeld (pH Aq. dest. 7,0, KCl 6,4; März) der Fall war, so war die Artenzahl noch größer:

Hantzschia amphioxys, *Navicula contenta* f. *biceps*, *Navicula Lagerstedti* var. *palustris*, *Navicula pelliculosa*, *Nitzschia frustulum*, *Pinnularia microstauron* var. *Brébissonii*, *Pinnularia viridis*, *Stauroneis anceps*, *Stauroneis montana lanceolata*, *Gomphonema parvulum*, *Achnanthes lanceolata*, *Surirella ovata*.

Gerade diese Probe enthielt mehrere der in dieser Arbeit seltener gefundenen Formen, wie dies an feuchten Standorten meist der Fall war.

In der Diatomeenflora von Wäldern aus kalkreichen Gegenden traten auch die für solche Böden charakteristischen Formen auf, nämlich *Achnanthes coarctata* und *Navicula mutica* var. *nivalis*, neben den sonst in Laubwäldern häufigen wie *Navicula contenta* f. *biceps*, *Nitzschia debilis* und *Pinnularia obscura*.

Die Diatomeenflora der Nadelwälder war dem gegenüber immer sehr arm. Fast alle Ansätze aus Nadelwäldern waren ohne Diatomeenentwicklung. Nur drei wiesen überhaupt Kieselalgenbesiedlung auf. Der eine von

ihnen (Hainberg bei Göttingen) enthielt *Hantzschia amphioxys* und *Pinnularia borealis*; der andere (Hoher Hagen bei Göttingen) die gleichen Arten und dazu noch *Navicula fossalis*, und der dritte (Weg Brocken-Harzburg)) ergab lediglich *Pinnularia microstauron*.

Da die Bodenreaktion in den Nadelwäldern größtenteils stark sauer und die Hydratur meistens ungünstig ist, ist nicht verwunderlich, daß die Erde bis auf seltene Ausnahmen ohne Diatomeenbewuchs war. Der Lichtmangel der Nadelwälder mag dabei auch eine Rolle spielen, doch dürfte seine Bedeutung kaum sehr stark ins Gewicht fallen; denn einige andere, sehr schattige Standorte waren gut mit Diatomeen besiedelt: Felspalte (pH Aq. dest. 6,8; Mai) in einer dunklen Schlucht bei Göttingen (Hoffmannshof) mit

Hantzschia amphioxys, *Navicula contenta* f. *biceps*, *Nitzschia debilis*, *Nitzschia stagnorum*,

und der enge Burghof der Hohensalzburg (pH Aq. dest. 6,9; Juni), deren neben einer ziemlich großen Formenmannigfaltigkeit eine sehr große Individuenzahl (Diatomeenentwicklung bis Verdünnung 7) zeigte und zwar

Hantzschia amphioxys, *Navicula caduca*, *Navicula cineta* var. *Heufleri*, *Navicula minima*, *Navicula mutica*, *Nitzschia palea*, *Amphoracantha montana*, *Achnanthes lanceolata*.

Auch in den Wäldern machte sich also der Einfluß der Feuchtigkeit und vor allem der Bodenreaktion wieder deutlich bemerkbar. In Laubwäldern genügte letztere meist den Ansprüchen der Diatomeen — daher eine recht hohe Artenzahl —, während die saure Reaktion der Nadelwälder wohl (neben der Individuenarmut) die sehr geringe Zahl an Arten bzw. das völlige Fehlen der Diatomeenflora bewirkte.

cc) Hauptfundorte der Diatomeen.

Tabelle VIII bringt noch einmal eine Aufstellung sämtlicher in den 167 Böden gefundenen 114 Arten und Formen mit Angabe ihrer Fundorte. Die Kieselalgen sind nach ihrer Gesamthäufigkeit geordnet, deren Prozentzahl in der ersten Rubrik angegeben ist. In den nächsten Spalten stehen wieder die Prozente, die die Häufigkeit an den verschiedenen Standorten (wasserreiche Erden, Äcker, Wiesen, ruhendes Land, Wälder) ausdrücken. Man kann so die Hauptfundorte der Arten feststellen:

Hantzschia amphioxys war insgesamt die häufigste Kieselalge. Sie steht auch in den Rubriken für die einzelnen Standorte an erster Stelle. Nur an wasserreichen Orten war sie wesentlich seltener. Sie wurde hier von sechs Formen, nämlich *Nitzschia palea*, *Pinnularia subcapitata*, *Navicula cryptocephala*, *Pinnularia microstauron* f. *diminuata*, *Achnanthes lanceolata* und *Frustulia vulgaris* an Häufigkeit überflügelt.

Während *Navicula mutica* in ihrer Gesamthäufigkeit *Hantzschia amphioxys* folgte und fast die Hälfte der untersuchten Bodenproben besiedelte, war sie an wasserreichen Standorten noch viel seltener als diese. Nur in 8,3 % solcher Erdproben war sie vorhanden. Auch Wälder waren nur spärlich von ihr bewachsen. Sehr oft dagegen traf man sie in Wiesen und ruhendem Land, auch in Äckern.

Tabelle VIII *). Häufigkeit der gesamten gefundenen Diatomeen
in

	d. ges. Böden	wasser- reichen Stand- orten	Äckern	Wiesen	ruhen- dem Land	Laub- wäld- ern
	%	%	%	%	%	%
<i>Hantzschia amphioxys</i>	82,6	33,3	88,2	76,9	84,2	80,0
<i>Navicula mutica</i>	42,0	8,3	52,9	61,5	60,5	20,0
<i>Nitzschia palea</i>	31,2	54,2	17,6	46,1	23,6	20,0
<i>Pinnularia borealis</i>	31,2	—	29,4	23,0	44,7	40,0
<i>Navicula contenta</i> f. <i>biceps</i>	30,4	8,3	—	46,1	31,5	55,0
<i>Navicula mutica</i> var. <i>ventricosa</i>	29,0	4,2	58,8	30,7	31,5	10,0
<i>Navicula mutica</i> var. <i>nivalis</i>	23,2	4,2	17,6	23,0	36,8	10,0
<i>Navicula atomus</i>	21,0	4,2	29,4	30,7	31,5	15,0
<i>Navicula cryptocephala</i>	18,1	37,5	5,8	23,0	7,9	10,0
<i>Pinnularia obscura</i>	18,1	8,3	5,8	38,4	13,1	40,0
<i>Achnanthes lanceolata</i>	18,1	37,5	—	15,3	5,2	10,0
<i>Navicula minima</i>	17,3	25,0	5,8	15,3	7,9	10,0
<i>Navicula cincta</i> var. <i>Heufleri</i>	16,6	16,6	—	15,3	15,8	15,0
<i>Amphora montana</i>	16,6	25,0	17,6	7,7	10,5	—
<i>Pinnularia subcapitata</i>	14,5	41,6	—	23,0	5,2	25,0
<i>Nitzschia debilis</i>	13,7	12,5	—	15,3	7,9	20,0
<i>Pinnularia microstauron</i> f. <i>diminuata</i>	13,7	37,5	5,8	—	—	10,0
<i>Navicula caduca</i>	11,6	—	29,4	7,7	15,8	10,0
<i>Stauroneis montana</i> var. <i>lanceolata</i>	10,9	8,3	17,6	30,7	7,9	15,0
<i>Navicula gibbula</i>	8,7	—	5,8	7,7	15,8	15,0
<i>Frustulia vulgaris</i>	8,7	33,3	—	7,7	—	—
<i>Nitzschia amphibia</i>	8,0	20,8	—	7,7	2,6	10,0
<i>Pinnularia microstauron</i>	8,0	12,5	—	7,7	2,6	—
<i>Stauroneis montana</i>	8,0	8,3	—	15,3	5,2	—
<i>Achnanthes minutissima</i>	8,0	16,6	—	7,7	7,9	5,0
<i>Navicula insociabilis</i>	7,3	8,3	—	23,0	5,2	15,0
<i>Stauroneis anceps</i>	7,3	4,2	29,4	7,7	10,5	5,0
<i>Navicula simplex</i>	6,5	29,4	5,8	—	—	—
<i>Surirella ovata</i>	6,5	4,4	—	7,7	2,6	5,0
<i>Navicula brekkaensis</i>	5,7	—	—	7,7	2,6	30,0
<i>Navicula excelsa</i>	5,7	—	17,6	—	13,1	—
<i>Navicula fossalis</i>	5,7	4,2	5,8	7,7	2,6	10,0
<i>Navicula mutica</i> var. <i>Cohnii</i>	5,7	4,2	17,6	15,3	2,6	—
<i>Nitzschia Harderi</i> nov. spec.	5,7	8,3	—	7,7	7,9	5,0
<i>Nitzschia perminuta</i>	5,7	8,3	—	5,3	5,2	—

*) Diese Tabelle ist bereits in den Nachrichten der Göttinger Akademie der Wissenschaften publiziert worden.

Tabelle VIII. (Fortsetzung.)

	d. ges. Böden	wasser- reichen Stand- orten	Äckern	Wiesen	ruhen- dem Land	Laub- wäld- ern
	%	%	%	%	%	%
<i>Pinnularia irrorata</i>	5,7	4,2	—	—	5,2	5,0
<i>Pinnularia viridis</i>	5,7	25,0	—	—	—	5,0
<i>Eunotia tenella</i>	5,7	25,0	—	—	—	5,0
<i>Pinnularia fasciata</i>	5,0	20,8	—	—	2,6	—
<i>Gomphonema parvulum</i>	5,0	20,8	—	—	—	5,0
<i>Eunotia lunaris</i>	4,3	20,8	—	—	—	—
<i>Surirella angustata</i>	4,3	12,5	—	15,3	2,6	—
<i>Diploneis ovalis</i>	4,3	12,5	—	7,7	—	—
<i>Navicula pelliculosa</i>	3,6	—	5,8	7,7	2,6	—
<i>Nitzschia interrupta</i>	3,6	8,3	—	—	—	—
<i>Pinnularia molaris</i>	3,6	8,3	—	7,7	—	—
<i>Eunotia exigua</i>	3,6	16,3	—	—	5,2	—
<i>Achnanthes coarctata</i>	3,6	4,2	11,7	—	5,2	5,0
<i>Navicula contenta</i>	2,9	—	—	—	5,2	10,0
<i>Navicula Lagerstedti</i>	2,9	—	—	—	5,2	—
<i>Rhopalodia gibberula</i>	2,9	4,2	—	—	—	—
<i>Nitzschia communis</i>	2,2	4,2	5,8	7,7	—	—
<i>Nitzschia linearis</i>	2,2	12,5	—	—	—	—
<i>Gomphonema angustatum</i>	2,2	8,3	—	7,7	—	—
<i>Amphora Normani</i>	2,2	8,3	—	—	—	—
<i>Amphora ovalis</i>	2,2	8,3	—	7,7	—	—
<i>Frustulia rhomboides</i> var. saxonica	2,2	—	—	—	5,2	5,0
<i>Tabellaria flocculosa</i>	2,2	8,3	—	7,7	—	—
<i>Meridion circulare</i>	2,2	12,5	—	—	—	—
<i>Navicula Harderi</i> nov. spec.	1,4	—	—	—	—	10,0
<i>Navicula perpusilla</i>	1,4	—	—	—	2,6	10,0
<i>Navicula seminulum</i>	1,4	4,2	—	—	—	—
<i>Navicula tantula</i>	1,4	—	—	—	—	10,0
<i>Nitzschia frustulum</i>	1,4	4,2	—	—	—	5,0
<i>Nitzschia stagnorum</i>	1,4	4,2	—	—	—	—
<i>Pinnularia mesolepta</i>	1,4	8,3	—	—	—	—
<i>Pinnularia microstauron</i> var. Brébissonii	1,4	4,2	—	—	—	5,0
<i>Pinnularia subcapitata</i> var. Hilseana	1,4	4,2	—	—	2,6	—
<i>Stauroneis Smithii</i>	1,4	8,3	—	—	—	—
<i>Epithemia sores</i>	1,4	4,2	—	—	2,6	—
<i>Cymbella naviculiformis</i>	1,4	4,2	—	7,7	—	—
<i>Caloneis silicula</i> var. truncatula	1,4	8,3	—	—	—	—
<i>Gyrosigma acuminatum</i>	1,4	8,3	—	—	—	—

Tabelle VIII. (Fortsetzung.)

	d. ges. Böden	wasser- reichen Stand- orten	Äckern	Wiesen	ruhen- dem Land	Laub- wäldern
	%	%	%	%	%	%
<i>Diatoma vulgare</i>	1,4	4,2	—	7,7	—	—
<i>Navicula bacillum</i>	0,7	4,2	—	—	—	—
<i>Navicula Clementis</i>	0,7	4,2	—	—	—	—
<i>Navicula dicephala</i>	0,7	—	—	7,7	—	—
<i>Navicula exilissima</i>	0,7	—	—	—	2,6	—
<i>Navicula fragilarioides</i>	0,7	—	—	—	—	—
<i>Navicula graciloides</i>	0,7	4,2	—	—	—	—
<i>Navicula Hambergi</i>	0,7	—	—	—	2,6	—
<i>Navicula hungarica</i> var. <i>capitata</i>	0,7	4,2	—	—	—	—
<i>Navicula incompta</i>	0,7	4,2	—	—	—	—
<i>Navicula Lagerstedti</i> var. <i>palustris</i>	0,7	—	—	—	—	5,0
<i>Navicula mutica</i> var. <i>binodis</i>	0,7	—	—	—	—	5,0
<i>Navicula muraliformis</i> nov. spec.	0,7	—	—	7,7	—	—
<i>Navicula pygmaea</i>	0,7	4,2	—	—	—	—
<i>Navicula radiosa</i>	0,7	4,2	—	—	—	—
<i>Navicula söhrensii</i>	0,7	4,2	—	—	—	—
<i>Navicula subseminulum</i> nov. spec.	0,7	—	—	—	—	5,0
<i>Nitzschia atomus</i> nov. spec.	0,7	4,2	—	—	—	—
<i>Nitzschia hungarica</i>	0,7	4,2	—	—	—	—
<i>Nitzschia obtusangula</i> nov. spec.	0,7	—	—	7,7	—	—
<i>Nitzschia parvula</i>	0,7	—	—	7,7	—	—
<i>Nitzschia vitrea</i> var. <i>salinarum</i>	0,7	—	—	—	2,6	—
<i>Pinnularia interrupta</i>	0,7	—	—	—	—	—
<i>Pinnularia lata</i>	0,7	—	—	7,7	—	—
<i>Pinnularia leptosoma</i>	0,7	4,2	—	—	—	—
<i>Stauroneis phoenicenteron</i>	0,7	4,2	—	—	—	—
<i>Gomphonema angustatum</i> var. <i>linearis</i>	0,7	4,2	—	—	—	—
<i>Gomphonema longiceps</i> var. <i>montana</i>	0,7	4,2	—	—	—	—
<i>Amphora ovalis</i> var. <i>pediculus</i>	0,7	4,2	—	—	—	—
<i>Eunotia pectinalis</i>	0,7	4,2	—	—	—	—
<i>Eunotia pectinalis</i> var. <i>minor</i>	0,7	—	—	7,7	—	—
<i>Eunotia praerupta</i> var. <i>inflata</i>	0,7	—	—	7,7	—	—
<i>Epithemia zebra</i> var. <i>porcellus</i>	0,7	4,2	—	—	—	—

Tabelle VIII. (Fortsetzung).

	d. ges. Böden	wasser- reichen Stand- orten	Äckern	Wiesen	ruhen- dem Land	Laub- wäld- ern
	%	%	%	%	%	%
<i>Cocconeis pediculus</i>	0,7	4,2	—	—	—	—
<i>Cocconeis placentula</i>	0,7	—	—	—	—	—
<i>Tabellaria fenestrata</i>	0,7	—	—	7,7	—	—
<i>Cymbella perpusilla</i>	0,7	4,2	—	—	—	—
<i>Meridion circulare</i> var. <i>constricta</i>	0,7	—	—	7,7	—	—
<i>Rhoicosphenia curvata</i>	0,7	4,2	—	—	—	—
<i>Cyclotella Meneghiniana</i>	0,7	4,2	—	—	—	—
<i>Fragilaria capucina</i>	0,7	4,2	—	—	—	—
Formen:	114	84	23	50	46	42
Gattungen:	24	24	7	15	11	10

Nitzschia palea hatte, wie schon bemerkt, ihre Hauptverbreitung an wasserreichen Standorten und kam auch in Wiesen in beträchtlicher Zahl vor.

Pinnularia borealis wiederum war für unkultiviertes Land und Wälder bezeichnend und fehlte an nassen Stellen.

Daß *Navicula contenta* f. *biceps* in auffallend vielen Laubwalderdproben zu finden war, wurde bereits betont. Sie fehlte in Äckern, während *Navicula mutica* var. *ventricosa* für diese außerordentlich charakteristisch war.

Viele Fundorte von *Navicula mutica* var. *nivalis* waren ruhendes unkultiviertes Land. *Navicula cryptocephala* jedoch war in solcher Erde selten, sie zog deutlich wasserreiche Standorte vor.

Im Vergleich zu ihrer Gesamthäufigkeit war *Pinnularia obscura* in Laubwäldern und Wiesen eine oft gefundene Kieselalge.

Stauroneis anceps war eine typische Ackerdiatomee, während *Stauroneis montana* und ihre Varietät *lanceolata* bezeichnend für Wiesen war.

Weitere Besonderheiten wurden bereits in den vorhergehenden Abschnitten behandelt. Es sei noch einmal auf das häufige Auftreten der im ganzen seltener gefundenen *Navicula brekkaensis* in Laubwäldern hingewiesen. Sie fehlte in Äckern und wasserreichen Standorten.

Für drei Formen fehlt die Fundortangabe, da sie je einmal an Standorten vorkamen, die sich schlecht in die Gruppen der anderen einreihen lassen. *Navicula fragilarioides* fand sich massenhaft in Mauerritzen des Botanischen Gartens Göttingen; *Pinnularia interrupta* in einer Moortasche bei Bad Elster (pu Aq. dest. 6,9, KCl 6,2; Juni) und *Cocconeis placentula* neben vielen anderen Diatomeen (u. a. *Nitzschia Harderi*) im Botanischen Garten Göttingen unter Fichten.

Von den selteneren Arten kam *Nitzschia stagnorum* außer an wasserreichen Standorten noch in einer Feldspalte (vgl. S. 434). *Nitzschia*

interrupta und *Rhopalodia gibberula* häufiger im Botanischen Garten Göttingen vor.

3. Moosrasen.

In der Literatur wird vielfach darauf hingewiesen, daß *Moose* eine reiche Diatomeenflora beherbergen. Um einen Einblick in diese Verhältnisse zu bekommen, wurden einige wenige (5) Moosproben untersucht (3 trockene Moospolster von Steinen und 2 feuchte, nämlich *Dicranum* von der Wurzel einer *Fichte* und *Sphagnum* aus einiger Entfernung von einem Teichrand).

Um auch hier Anreicherung der Arten zu erzielen, wurden die Moose mehrmals mit Wasser getränkt, über einem Sieb ausgedrückt und dieser Extrakt zentrifugiert. Von dem so erhaltenen konzentrierteren Medium wurden Flüssigkeitskulturen in Reagenzgläsern angesetzt. Die Entwicklung war durchweg gut.

Von den ermittelten 35 Formen, die sich auf 33 Arten von 12 Gattungen verteilen, waren nur 6 neu, die übrigen waren schon aus den Erdproben isoliert worden.

In Tabelle IX sind zunächst die 6 nur auf Moos gefundenen genannt und dann die übrigen in der Reihenfolge ihrer Häufigkeit in den fünf Proben aufgezählt.

Es bestand ein deutlicher Unterschied zwischen den trockenen und feuchteren Standorten. Für erstere waren charakteristisch: *Hantzschia amphioxys*, *Navicula Lagerstedti*, *N. mutica* und ihre Varietäten, *Nitzschia debilis* und *Pinnularia borealis*; für letztere: *Nitzschia palea*, *Navicula simplex*, *Achnanthes hungarica* und *Amphora Normani*. Auf beiden fanden sich *Navicula contenta* f. *biceps*, *N. cryptocephala* und *Caloneis lepidula*. *Navicula contenta* f. *biceps* kam als Massenform nur auf einer trockenen Moosprobe vor. Die Zusammensetzung der Diatomeenflora trockener Moose ähnelt sehr der trockener Erde, die feuchter Moose derjenigen wasserreicher Standorte.

C. Neue Arten.

Herr Dr. HUSTEDT hatte die Freundlichkeit, die neuen Arten zu bestimmen, ihre Diagnose aufzustellen, sie zu zeichnen und die Abbildungen dieser Arbeit zur Verfügung zu stellen.

1. *Navicula Harderi* nov. spec. (Abb. 4).

Schalen lanzettlich mit stark konvexen Seiten und spitz gerundeten, nicht vorgezogenen Enden, 9–13 μ lang, 3–4 μ breit. Raphe gerade, fadenförmig, mit entfernt gestellten Zentralporen. Axialarea sehr schmal, linear, Zentralarea eine breite, bis an den Schalenrand reichende Querbinde. Transapikalstreifen ziemlich stark radial, etwa 28 in 10 μ . Ähneln in ihrer Form der *Caloneis bacillum* var. *lanceolata* (Schulz) Hust., unterscheidet sich aber außer durch den Mangel der für *Caloneis* charakteristischen Längslinie durch stärker radiale Streifung und die enge Axialarea.



Abb. 4. *Nitzschia Harderi* nov. spec.

Tabelle IX. *Moosrasen*.

		Zahl des Vorkommens in 5 Moosen	Zahl des Vorkommens als Massenform
1.	<i>Achnanthes hungarica</i>	2	2
2.	<i>Synedra ulna</i>	2	—
3.	<i>Caloneis lepidula</i>	2	—
4.	<i>Navicula festiva</i>	1	—
5.	<i>Pinnularia gibba</i> var. <i>parva</i>	1	—
6.	<i>Synedra capitata</i>	1	—
7.	<i>Navicula contenta</i> f. <i>biceps</i>	4	1
8.	<i>Navicula mutica</i>	4	1
9.	<i>Nitzschia palea</i>	4	2
10.	<i>Navicula cryptocephala</i>	3	—
11.	<i>Navicula mutica</i> var. <i>nivalis</i>	3	1
12.	<i>Pinnularia borealis</i>	3	—
13.	<i>Achnanthes coarctata</i>	3	—
14.	<i>Hantzschia amphioxys</i>	3	1
15.	<i>Navicula Lagerstedti</i>	2	1
16.	<i>Navicula radiosa</i>	2	—
17.	<i>Navicula simplex</i>	2	—
18.	<i>Nitzschia amphibia</i>	2	—
19.	<i>Nitzschia debilis</i>	2	—
20.	<i>Nitzschia interrupta</i>	2	—
21.	<i>Gomphonema parvulum</i>	2	2
22.	<i>Amphora Normani</i>	2	1
23.	<i>Achnanthes lanceolata</i>	2	—
24.	<i>Cyclotella Meneghiniana</i>	2	—
25.	<i>Navicula atomus</i>	1	—
26.	<i>Navicula cincta</i> var. <i>Heufleri</i>	1	—
27.	<i>Navicula insociabilis</i>	1	—
28.	<i>Navicula mutica</i> var. <i>ventricosa</i>	1	—
29.	<i>Navicula tantula</i>	1	—
30.	<i>Pinnularia molaris</i>	1	—
31.	<i>Pinnularia obscura</i>	1	—
32.	<i>Amphora montana</i>	1	—
33.	<i>Cocconeis placentula</i>	1	—
34.	<i>Rhopalodia gibberula</i>	1	—
35.	<i>Caloneis silicula</i> var. <i>truncatula</i>	1	—

2. *Navicula muraliformis* nov. spec. (Abb. 5).

Schalen elliptisch mit breit gerundeten Enden, 10—12 μ lang, 3,5—5 μ breit. Raphe gerade, fadenförmig, Axialarea schmal linear, in der Mitte nicht erweitert, daher ohne Zentralarea. Transapikalstreifen zart, aber verhältnismäßig weit gestellt, etwa 20 in 10 μ , durchweg senkrecht zur Mittel-

linie. Die Art ähnelt habituell der *Navicula muralis* Grun., ist aber zarter und unterscheidet sich besonders durch die entfernter gestellten Transapikalstreifen.

Abb. 5. *Navicula muraliformis* nov. spec.Abb. 6. *Navicula subseminulum* nov. spec.

3. *Navicula subseminulum* nov. spec. (Abb. 6).

Schalen linear-lanzettlich mit leicht konvexen Seiten und stumpf gerundeten Enden, etwa $10-15\ \mu$ lang, $3-4\ \mu$ breit. Raphe gerade, fadenförmig, mit voneinander entfernt gestellten Zentralporen. Axialarea sehr eng, linear, Zentralarea groß, im Umriß rundlich quadratisch. Transapikalstreifen leicht radial, $20-24$ in $10\ \mu$, in der Mitte stark aber gleichmäßig verkürzt und etwas entfernter gestellt, etwa 16 in $10\ \mu$. Steht der *Navicula seminulum* nahe, unterscheidet sich aber besonders durch die entfernt gestellten Zentralporen und die große Zentralarea.

4. *Nitzschia atomus* nov. spec. (Abb. 7).

Schalen lanzettlich mit ziemlich spitz gerundeten, oft leicht geschnäbelten Enden und schwach konvexen, nur in kleinen Individuen stärker gewölbten Seiten, $7-12\ \mu$ lang, $1,5-2\ \mu$ breit. Zellen in Gürtelbandansicht schmal linear. Kiel stark exzentrisch, Kielpunkte sehr klein, kaum erkennbar, entfernt gestellt, etwa 10 in $10\ \mu$. Transapikalstreifen kräftig, $18-20$ in $10\ \mu$, aber ohne erkennbare Punktierung. Unterscheidet sich von kleinen Formen von *Nitzschia amphibia* und des Formenkreises von *Nitzschia frustulum* durch die winzigen Kielpunkte und die für die geringe Größe unverhältnismäßig grobe Streifung, die aber im Gegensatz zu *Nitzschia amphibia* keine deutliche Punktierung zeigt. Der Schalenumriß unterliegt den bei lanzettlichen Formen allgemein verbreiteten Variationen: Die größeren Individuen sind schmal-lanzettlich mit kaum oder (meistens) gar nicht vorgezogenen Enden, die kleineren sind breiter lanzettlich und neigen zur Ausbildung geschnäbelter Enden.

Abb. 7. *Nitzschia atomus* nov. spec.

5. *Nitzschia Harderi* nov. spec. (Abb. 8).

Schalen linear mit parallelen Seiten und kurz vorgezogenen, schwach geschnäbelten, ziemlich stumpf gerundeten Enden, um $30\ \mu$ lang, etwa $3,5\ \mu$ breit. Zellen in Gürtelbandansicht breit linear mit abgerundeten Ecken und geraden bis leicht konvexen Seiten. Kiel stark exzentrisch, Kielpunkte ziemlich groß, unregelmäßig gestellt, $7-10$ in $10\ \mu$. Struktur äußerst zart, transapikale Streifung bisher nicht aufgelöst (2 mm Apochromat, 1,40 num.

Ap., Einbettung in Hyrax). Unterscheidet sich von ähnlichen Formen aus der Gruppe der *Nitzschia palea*, besonders von *Ni. Kützingiana*, durch die lineare Gestalt und die größeren Kielpunkte.

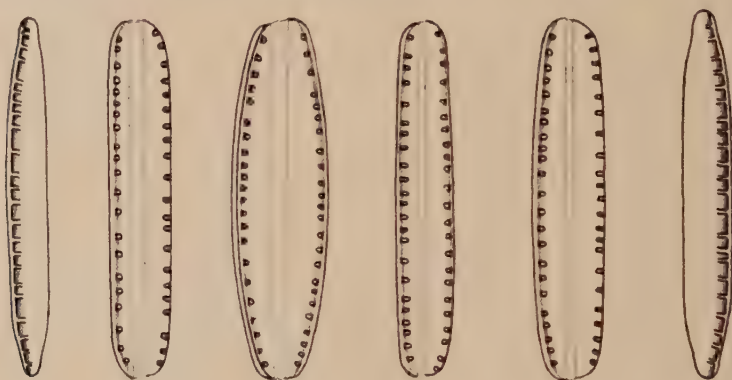


Abb. 8. *Nitzschia Harderi* nov. spec.

6. *Nitzschia modesta* nov. spec.⁶ (Abb. 9).

Schalen linear mit parallelen Seiten und kurz keilförmig verschmälerten, ziemlich stumpf gerundeten Enden, etwa 18–23 μ lang, um 3 μ breit. Kiel stark exzentrisch, Kielpunkte verhältnismäßig groß, 8–10 in 10 μ . Transapikalstreifen kräftig, etwa 20 in 10 μ . Punktierung aber kaum erkennbar. Steht zwischen *Nitzschia amphibia* und dem Formenkreise von *Nitzschia frustulum*,

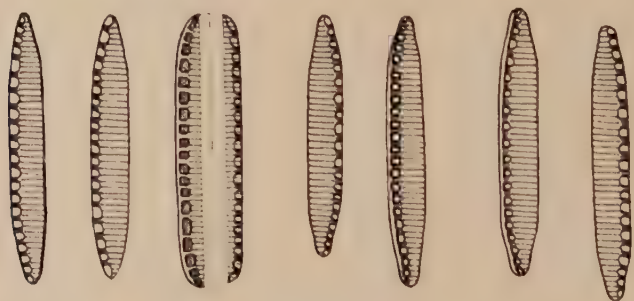


Abb. 9. *Nitzschia modesta* nov. spec.

insbesondere *Ni. Hantzschiana*. Von *Ni. amphibia* ist sie durch dichtere Streifung und die deutliche Punktierung verschieden, während andererseits die Struktur der neuen Form doch so grob ist, daß eine Verbindung mit den noch feiner strukturierten Formen aus der Verwandtschaft von *Ni. frustulum* ausgeschlossen erscheint.

⁶ Die Art wurde erst nachträglich bestimmt, so daß ihr Auftreten in einer Wiese unterhalb des Roßkopfes an der Werra (Grauwacke, pH 6,2, Januar) im vorstehenden Text nicht mit berücksichtigt werden konnte.

7. *Nitzschia obtusangula* nov. spec. (Abb. 10).

Schalen linear-lanzettlich mit schwach konvexen Seiten und stumpf gerundeten, nicht vorgezogenen Enden, etwa $15\text{--}18\mu$ lang, um 3μ breit. Kiel stark exzentrisch, Kielpunkte auffallend groß, $6\text{--}10$ in 10μ (mei-



Abb. 10. *Nitzschia obtusangula* nov. spec.

stens 8). Struktur der Zellwand äußerst zart, bisher nicht aufgelöst (Hyraxpräparat, Apochr. 2 mm, 1,40 num. Ap.). Unterscheidet sich von den übrigen kleinen Arten ohne erkennbare Struktur durch die großen Kielpunkte.

III. Besprechung der Ergebnisse.

Arbeiten, die sich speziell mit *Erddiatomeen* beschäftigen, gibt es bisher nicht.

Die Ergebnisse der vorstehenden Untersuchungen über die Verbreitung der *Erddiatomeen* bestätigen jedoch zum großen Teil die Befunde über *Gewässerdiatomeen* und die Angaben solcher Autoren, die neben anderen Algenklassen im Erdboden auch *Erddiatomeen* behandelten.

1. Individuenzahl.

Vergleicht man die Individuenzahl je ccm Erde mit denen anderer Autoren, so fällt ihre ungewöhnliche Höhe (nämlich bis 100 Millionen) auf. KOFFMANN (1934) fand durch direkte Zählmethode 290 000 Zellfragmente von *Algen* und 1 Million *Algenzysten* in 1 g Erde⁷. FEHER (1933) gibt etwa 50 000 *Algen* an, PETERSEN (1935) bis 3 Millionen je ccm. Zieht man in Betracht, daß bei uns nur die Werte für *Diatomeen* angegeben sind, nicht aber die für die übrigen *Algen*⁸, von denen

⁷ Nach eigenen Wägungen wiegt 1 ccm Erde in dem von mir verwendeten Auflockerungszustand 0,9–1,2 g je nach Feuchtigkeit und Struktur des Bodens. JANKE (1933) fand ungefähr das Doppelte an *Bakterien* in 1 ccm Erde wie in 1 g, z. B. in 1 g Wiesenerde 781 160 000, in 1 ccm Wiesenerde 1 445 100 000; danach wäre also 1 ccm Erde etwa doppelt soviel wie 1 g.

⁸ Nach FEHER (1933) überwiegen in Waldböden die *Chlorophyceen*, meist auch die *Schizophyceen*, über die *Zygophyten* (*Bacillariaceen* und *Conjugaten*); JOHNS Befunde (1942) ergaben ebenfalls ein Vorherrschen der *Chlorophyceen* und *Cyanophyceen*; *Heterokonten* kamen in seinen Böden seltener als *Diatomeen* vor. FRANCE (1921) gibt das Verhältnis 6:2 (z. Zt. der Schneeschmelze 7:2) für *Diatomeen* gegenüber den übrigen Organismen im Boden an. WEINTRAUT (1943) fand, daß das Verhältnis im Laufe des Jahres sehr verschieden war.

hauptsächlich einzellige *Grünalgen* auch in den letzten Verdünnungen vorkamen, so ergeben sich für unsere Böden ungeheure Zahlen von Algenkeimen in 1 cm Erde. Da nicht anzunehmen ist, daß das Auftreten von Algen in den letzten Verdünnungen nur durch Zufälle zustandegekommen sein kann, so dürfte die Zahl der Algen im Boden tatsächlich größer sein, als man bisher annahm.

2. Einfluß der Umweltfaktoren auf die Individuenzahl.

Man kennt schon längst die pH -Beziehungen bei Algen im allgemeinen und Diatomeen im speziellen. Bei unseren Untersuchungen trat die Vorliebe der Diatomeen für alkalisches Substrat (vgl. HUSTEDT, 1937/39, KOLBE, 1932, PETERSEN, 1935, SCHELHORN, 1936, JOHN, 1942, KRASSKE, 1943) deutlich hervor, ebenso der fördernde Einfluß der Feuchtigkeit auf den Diatomeenreichtum des Bodens (FRANCÉ, 1921, FEHÉR, 1933, PETERSEN, 1935). Daher waren die wasserreichen Standorte am individuenreichsten, wenn sie nicht extrem sauer waren.

Nach FRANCÉ (1921), GISTL (1933) und PETERSEN (1935) dürfte die Düngung der Grund dafür sein, daß sich als nächst individuenreich die kultivierten Böden erwiesen; jedoch waren Äcker individuenärmer als Wiesen, wobei die größere Feuchtigkeit vieler Wiesen ausschlaggebend sein dürfte. Über die unkultivierten Böden sank die Individuenzahl bis zu den Wäldern, wobei das fast gänzliche Fehlen der Diatomeen in Nadelwäldern durch deren saure Bodenreaktion (pH meist unter 4) bedingt sein dürfte.

3. Artenzahl.

Bei unseren Untersuchungen wurden in den 167 Böden insgesamt 114 Formen von 100 Arten aus 24 Gattungen gefunden. Das ist viel im Vergleich zu den bisherigen Literaturangaben⁹, wenig im Verhältnis zu dem, was in Moosrasen und vor allem in Gewässern vorkommt [nach HUSTEDT (1942) in Moosrasen 147 Formen und (1937/39) in 683 Proben tropischer Gewässer 645 Formen von 445 Arten und 45 Gattungen]. Während für Gewässer 200 Formen in einer Probe nichts seltenes sind, muß man einen Boden mit mehr als 10 Arten bzw. Formen schon als formenreich bezeichnen; mehr als 20 Arten wurden nur sehr selten gefunden. Bei Ansätzen der Erdproben auf Agar oder in Flüssigkeit wurden ungefähr gleichviel Diatomeenarten bzw. -formen gefunden, wogegen JOHN (1942) wesentlich weniger Diatomeen in Flüssigkeitskulturen als in seinen „moist-cultures“ fand und deshalb Diatomeenlisten allein nach Flüssigkeitskulturen für unvollständig hält. Auch die durchschnittliche Artenzahl eines einzelnen Bodens war bei unserem Material bei beiden Kulturen fast die gleiche.

⁹ Anmerkung bei der Korrektur: LUND (New Phytologist 1946, 45, 56) gibt für englische Böden 52 Arten an; die Arbeit wurde mir erst nach der Drucklegung bekannt.

Wie bei HUSTEDT (1942, in Sumpfwiesen), so hatten auch in unseren Böden den Hauptanteil an den Formen die Gattungen *Navicula*, *Nitzschia* und *Pinnularia*. Die gemeinste Kieselalge war *Hantzschia amphioxys*, die auch bei den bisherigen Erduntersuchungen stets am häufigsten gefunden wurde (FRANCÉ, 1921, KOLBE, 1932, PETERSEN, 1935). Ihre besondere Widerstandsfähigkeit ergibt sich auch daraus, daß FEHÉR (1933) und PETERSEN (1935) *Hantzschia amphioxys* in gefrorener Erde fanden. Auch im Botanischen Garten in Göttingen konnte sie in gefrorener Februar-Erde festgestellt werden, jedoch nicht allein, sondern gemeinsam mit *Navicula mutica* var. *nivalis* und *Navicula contenta* f. *biceps*. In großer Menge (Auftreten in Verdünnung 4) fand sie sich auch in äußerst trockener Erde von einer stark besonnten Weinbergmauer am Südhang des Steinbergs bei Würzburg; hier völlig allein. An zweiter Stelle stand nicht wie bei KOLBE (1932) und FRANCÉ (1921) *Pinnularia borealis* sondern *Navicula mutica*.

4. Bedeutung der Reaktion.

Nach HUSTEDT (1943) „läßt sich eine Gruppierung der Diatomeen mit Hilfe des pH-Wertes zum Zwecke ihrer ökologischen Charakteristik vornehmen“; sie wurde auch vorstehend für die häufigsten Arten bzw. Varietäten durchgeführt. Die meisten Formen kamen im pH-Bereich 6,9—6,0 vor, was HUSTEDT (1937/39) und KRASSE (1943) auch für Gewässerdiatomeen feststellten. Die Gattungen *Pinnularia* und *Eunotia* sind durch PETERSEN (1935) und JOHN (1942), durch HUSTEDT (1937/39) auch *Tabellaria* und *Frustulia*, als säureliebende Gattungen bekannt; unsere Ergebnisse bestätigten dies. Daß *Navicula mutica* var. *nivalis* und *Achnanthes coarctata* nach JOHNS Feststellung (1942) nur auf Kalkböden vorkommen sollen, ist auch nach unseren Befunden insofern wahrscheinlich, als diese Formen auch bei unseren Untersuchungen stets in alkalischen oder höchstens sehr schwach sauren Böden gefunden wurden, und Kalkgehalt und alkalische Reaktion meist Hand in Hand gehen. Dagegen konnte die Angabe JOHNS (1942), daß *Nitzschia palea* nur auf alkalischen Böden vorkäme, nicht bestätigt werden. Es scheint übrigens, als ob Formen, die saures Substrat bevorzugen, besser auf Agar gedeihen, diejenigen, die vorwiegend aus alkalischen Böden stammen, besser in Flüssigkeitskulturen. Auch bei JOHN (1942) wuchs *Navicula mutica* var. *nivalis* besser in Flüssigkeit.

Kalkgehalt des Bodens wirkte sich sowohl in der Arten- als auch Individuenzahl günstig auf das Diatomeenwachstum aus.

5. Bedeutung der Feuchtigkeit.

An feuchten Standorten war die Zahl der Arten größer als an trockenen, jedoch nicht einfach so, daß an trockenen Stellen gewisse Arten wegfallen, die der größeren Trockenheit nicht gewachsen sind; sondern von den in unseren Böden gefundenen 114 Formen kamen zwar 63 nur oder vorwiegend an feuchten Standorten (in der Nähe

eines Gewässers) vor, aber 11 waren indifferent, und 40 traten sogar selten oder nie an nassen Stellen (nahe einem Gewässer) auf. PETERSEN fand dagegen bei früheren Untersuchungen (1912) von 36 Formen 24 hauptsächlich in Erde, während 9 ebenso oft im Wasser wie in Erde vorkamen, und 4 als Gewässerdiatomeen betrachtet werden mußten und nur gelegentlich im Boden getroffen wurden. Was FRANCÉ (1921) für edaphische Lebensformen im allgemeinen feststellte, konnte also für Diatomeen bestätigt werden: die Zahl der Arten steigt mit zunehmendem Wassergehalt.

Von den Hauptgattungen waren *Nitzschia* und *Pinnularia* charakteristisch für feuchte Standorte, während die Hauptmasse der *Navicula*-Arten an trockeneren Stellen zu treffen war.

6. Sonstige Bedingungen.

PETERSENS Beobachtung (1935), daß kahler Boden artenreicher sei als bewachsener, traf für Diatomeen nicht zu. Vielmehr zeigte sich deutlich die Eintönigkeit und Artenarmut der Diatomeenflora des Ackerbodens, von der schon FRANCÉ (1921) schreibt. Wiesen enthielten wesentlich mehr Arten; auch unkultiviertes Land war recht abwechslungsreich von Diatomeen besiedelt. Waldböden waren zwar weit individuenärmer als Ackerland (vgl. KOLBE, 1932), doch war die Zahl der Diatomeenarten nach unseren Befunden in Laubwäldern fast doppelt so groß.

An allen Standorten machte sich der Einfluß der Bodenreaktion und Feuchtigkeit bemerkbar. Feuchtigkeit vergrößerte die Artenzahl, saure Reaktion verringerte sie in der Regel und brachte stets die für sie charakteristische Flora hervor. Bei alkalischer Reaktion traten ebenfalls bezeichnende Arten auf.

Die Feststellung KOLBES (1932), daß mit Urin gedüngte Erde ein ungünstiges Substrat für Diatomeen wäre, konnte bestätigt werden.

Nach Untersuchungen des Ostseestrandes und des Salzachufers scheint heller quarzhaltiger Sand ungeeignet für Diatomeenwachstum zu sein.

Bei der Aufstellung der Hauptfundorte aller Diatomeen traf FRANCÉS Beobachtung (1921), wonach *Navicula mutica* eine Acker- und Wiesen-diatomee ist, zu. *Navicula brekkaensis* war neben *Navicula contenta* f. *biceps*, *Pinnularia borealis* und *P. obscura* charakteristisch für Laubwälder.

7. Moosrasen.

Einige in Flüssigkeitskulturen angesetzte Moosproben waren, wie nach der Literatur (HUSTEDT 1934, 1942) zu erwarten war, gut von Diatomeen besiedelt. Wie bei der Erde, so bestand auch hier ein deutlicher Unterschied in der Diatomeenflora feuchter und trockener Moosrasen.

Zusammenfassung.

1. 167 Bodenproben verschiedenster deutscher Herkunft zwischen Ostsee und den Alpen wurden auf ihren Gehalt an Diatomeen untersucht a) auf Agar zur qualitativen, b) in Flüssigkeit zur quantitativen Erfassung der Arten. Die Flüssigkeitskulturen wurden nach der Methode von PETERSEN (1935) angesetzt. Dabei wurde eine besonders für Diatomeen modifizierte „Erdschreiberlösung“ verwendet. Die Bestimmung der Arten erfolgte an geglähten Dauerpräparaten.

2. Der größte Teil der Ansätze auf Agar war individuenreich. In Flüssigkeit traten Diatomeen am häufigsten bis Verdünnungsstufe 3 auf, d. h. es mußten mindestens 10 000 Zellen je ccm Erde im Ausgangssubstrat enthalten gewesen sein. Die höchste gefundene Zahl war 100 Millionen im ccm Erde.

3. Entscheidenden Einfluß auf die Besiedlungsdichte der Erden hatte die Bodenreaktion: alkalisches bis schwach saures Substrat war individuenreich, stark saures wesentlich -ärmer.

Die fördernde Wirkung der Feuchtigkeit wurde durch die Bodenreaktion stark beeinflußt, ebenso umgekehrt.

Die individuenreichsten Standorte waren die wasserreichen Böden, es folgten die kultivierten, dann die unkultivierten und die Laubwälder; selten oder gar nicht von Diatomeen belebt waren Nadelwälder (wegen der sauren Reaktion ihrer Böden).

4. Die insgesamt gefundenen 114 Formen verteilen sich auf 100 Arten und 24 Gattungen und gehören mit Ausnahme einer Centralen zu den Pennalen. Durchschnittlich enthielten die Erdproben etwas weniger als 7 verschiedene Diatomeen je Ansatz; Ansätze mit mehr als 10 Formen waren als artenreich zu bezeichnen (23 Böden); mehr als 20 Arten wurden in nur 3 Erden gefunden, manche Böden (mehr als 10%) waren dagegen ganz frei von Diatomeen.

5. Die Bodenreaktion wirkte sich an der Artenzusammensetzung der Diatomeenflora aus. Der größte Teil der Formen gedieh bei pH 6,9—6,0. Für alkalische bzw. saure Böden waren bestimmte Kieselalgen charakteristisch.

6. Wasserreiche Standorte (Ufer, Grabenränder, Tümpel u. dgl.) waren reich an Arten, die fast $\frac{3}{4}$ der 114 bestimmten ausmachten und sich auf alle 24 Gattungen verteilten. Die größte Zahl der *Nitzschien* und auch *Pinnularien* lebte in feuchtem bis sehr feuchtem Substrat, während die meisten *Navicula*-arten bezeichnend für normal durchfeuchtete bis trockene Böden waren.

7. Äcker waren zwar individuenreich, doch ihre Artenkombination war recht eintönig. Nur 23 Formen aus 7 Gattungen kamen hier vor.

Die Zahl der Arten bzw. Formen, die in Wiesen gefunden wurde (nämlich 51), war wesentlich größer als die der Äcker. Der Grund dafür dürfte die häufig recht feuchte Bodenbeschaffenheit sein.

Ruhendes, d. h. unkultiviertes Land war trotz der geringeren Individuenzahl ebenfalls formenreicher als Äcker. Aus 11 Gattungen wurden hier insgesamt 46 Formen gefunden.

Das gleiche gilt für Laubwälder, in denen auch mehrere seltener gefundene Arten bzw. Varietäten vorkommen.

Nadelwälder waren nicht nur individuen- sondern auch formenarm.

8. Kalkgehalt des Bodens wirkte sich günstig auf das Diatomeenwachstum aus.

9. Aus Tabelle 9 sind die Hauptfundorte der 114 Formen ersichtlich.

10. Die Entwicklung von Diatomeen aus einigen Moosproben, die in Flüssigkeitskulturen untersucht wurden, war durchweg gut. Die Diatomeenflora trockener Moose ähnelte der trockener Erde, die feuchter Moose der wasserreicher Standorte.

11. 7 neue Arten wurden gefunden.

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von Herrn Professor Dr. R. HARDER durchgeführt, dem ich meinen herzlichen Dank ausspreche. Ganz besonders danke ich auch an dieser Stelle noch einmal Herrn Dr. F. HUSTEDT für seine Hilfe und die vielseitige Förderung der Arbeit.

Literatur.

BEGER, H.: Atmosphärische Moosdiatomeen in den Alpen. Vierteljahrsschr. Naturf. Ges. Zürich, **73**, 382—404 (1928). Referat in Bot. Zbl. **15**, N. F., 54 (1929/30).

DEINES, G. u. KÜRBIS, P.: Die Säuregradzahl. Ztschr. Pflanzenern., Düngung und Bodenkunde, **40**, 141—148 (1935).

ELLENBERG, HEINZ: Über Zusammensetzung, Standort und Stoffproduktion bodenfeuchter Eichen- und Buchenmischwaldgesellschaften Nordwestdeutschlands. Mitt. d. flor. soz. Arbeitsgem. in Niedersachsen Heft 5, 1—135 (1939).

FEHÉR, D.: Mikrobiologie des Waldbodens, Bln. 1933. — FÖYR, BJÖRN: Lebenszyklus der Chlorophyceae *Cladophora Suhriana* Kütz. Arch. f. Prot. kde. **83**, 1—56 (1934). — FRANCÉ, R.: Das Edaphon, Stuttgart 1921.

GISTL, R.: Zur Kenntnis der Erdalgen. Arch. f. Mikrobiol. **3**, 634—649 (1932). — GISTL, R.: Erdalgen und Düngung, Erdalgen und Anionen. Arch. f. Mikrobiol. **4**, 348—378 (1933).

HÄMMERLING, J.: Entwicklung und Formbildungsvermögen von *Acetabularia mediterranea*. Biol. Zbl. **51**, 633—647 (1931). — HUSTEDT, FR.: Bacillariophyta in Pascher, Die Süßwasserflora Mitteleuropas, 2. Auflage. Jena 1930. — HUSTEDT, FR.: Die Kieselalgen Deutschlands, Österreichs und der Schweiz. Rabenhorst, Kryptogamenflora. Leipzig 1927. — HUSTEDT, FR.: Die Diatomeenflora von Poggenpohls Moor bei Dötlingen in Oldenb. Abh. u. Vorträge Bremer Wiss. Ges. Heft 8/9, 362—403 (1934). — HUSTEDT, FR.: Systematische und ökologische Untersuchungen über die Diatomeenflora von Java, Bali und Sumatra. Arch. Hydrob. Suppl. **15/16**, 133—790; 1—394 (1937/39). — HUSTEDT, FR.: Die Diatomeenflora einiger Sumpfwiesen bei Bremen. Abh. Naturwiss. Verein Bremen **XXXII**, H. 1, 184—221 (1942). — HUSTEDT, FR.: Aerophile Diatomeen in der nordwestdeutschen Flora. Ber.

d. Dtsch. bot. Ges. **60**, 55—73 (1942). — HUSTEDT, FR.: Die Diatomeenflora einiger Hochgebirgsseen der Landschaft Davos in den Schweizer Alpen. Intern. Rev. d. Ges. Hydrobiol. **1943**, 225—280.

JOHN, R. P.: An ecological and taxonomic study of the algae of British soils. Ann. of Bot. NS. Vol. **VI**, No. 22, 323—349 (1942). — JANKE, ALEX, SEKERA, FR. u. SZILVINYI, A.: Mikrobiologische Bodenuntersuchungen im Lunzer Gebiet. Standortsfaktoren und Keimgehalt. Arch. f. Mikrobiol. **5**, 222—245 (1934).

KOFFMANN, M.: Die Mikrofauna des Bodens, ihr Verhältnis zu anderen Organismen und ihre Rolle bei den mikrobiologischen Vorgängen im Boden. Arch. f. Mikrobiol. **5**, 246—302 (1934). — KOLBE, R. W.: Grundlinien einer allgemeinen Ökologie der Diatomeen. Erg. d. Biol. **8**, 221—348 (1932). KRASSKE, G.: Zur Diatomeenflora Lapplands. Ber. d. Dtsch. Bot. Ges. **61**, 81—88 (1943).

PETERSEN, J. B.: Studies on the biology and taxonomy of the soil algae. Kopenhagen 1935. — PRINGSHEIM, E. G.: Kulturversuche mit chlorophyllführenden Mikroorganismen. Beiträge zur Biologie der Pflanzen **14**, 283—312 (1926).

RICHTER, O.: Reinkulturen der Diatomeen. Ber. d. Dtsch. Bot. Ges. **21**, 493—506 (1903). — RICHTER, O.: Zur Physiologie der Diatomeen. Sitzber. d. Kaiserl. Akadem. der Wiss. Wien **115**, Abt. 1, 1—6 (1906).

SEIFERT, F.: Boden und Bodenwasser in Abderhalden, E., Handb. d. biol. Arbeitsmeth. Abt. XI, Tl. 5, Heft 4, 729—822 (1932). — v. SCHELHORN, M.: Zur Ökologie und Biologie der Erdalgen. Naturw. u. Landw. **1936**, 1—52. SCHMIDT, A.: Atlas der Diatomaceenkunde. Aschersleben-Leipzig 1874—1941. — SCHREIBER, E.: Die Reinkultur von marinem Phytoplankton und deren Bedeutung für die Produktionsfähigkeit des Meereswassers. Wiss. Meeresunters. Abt. Helgoland, **16**, 1—34 (1928). Abh. Nr. 10. — STEINER, M.: Herstellung und Prüfung der geeigneten Reaktionsbedingungen. Die Methoden der Fermentforsch. Leipzig 1941, 761—833.

WEINTRAUT, Th.: Zur Kenntnis der Erdalgen. Sitzber. d. Bayr. Akad. d. Wiss. München **1943**, 93—125.

(Aus der Biologischen Zentralanstalt der US- und britischen Zone.
Institut für Bakteriologie und Serologie, Braunschweig-Gliesmarode.)

Mikrobiologischer Beitrag zur Klärung der Ursachenfrage in der Meteorobiologie.

Von

H. BORTELS.

Mit 31 Textabbildungen.

(Eingegangen am 27. März 1948.)

In einer großen Zahl medizinisch-meteorologischer Veröffentlichungen [1, 10, 30, 31, 32, 41] wurde am Menschen, vereinzelt auch am Tier [25] und an der höheren Pflanze [36] nachgewiesen, daß zwischen dem Ablauf biologischer und meteorologischer Vorgänge enge Zusammenhänge bestehen. Zur gleichen Feststellung führten eigene Untersuchungen, die sich aber in erster Linie nicht auf den Menschen, sondern auf Mikroorganismen, besonders *Bakterien* erstreckten [2, 3, 4, 5, 37]. Dabei wurde eine stets wiederkehrende einfache Beziehung gefunden, nämlich Aktivierung biologischen Geschehens bei antizyklonalem und Lähmung desselben bei zyklonalem Wetter. Schließlich ergab sich auch, daß Bakterien unter Umständen schon in wenigen Minuten vor Wolkenauflösung eine Belebung erfahren und umgekehrt eine Lähmung vor Wolkenbildung [4].

Auf dem von mir eingeschlagenen Wege zur Auffindung der eigentlichen Ursache solcher zum Teil verblüffender Wirkungen sollte durch experimentelles Ausschließen einer Möglichkeit nach der anderen das wirksame Prinzip gewissermaßen immer enger eingekreist werden. Erste Versuche in dieser Richtung wurden in anderen Mitteilungen kurz erwähnt [2, 37]. Damals schon ließen die Ergebnisse den Gedanken an Strahlung als Ursache aufkommen, wenn auch noch ganz ungewiß.

Weitere eigene Untersuchungen sollen im folgenden beschrieben werden. Sie stellen allerdings nichts Abgerundetes dar, weil sie aus kriegsbedingten Gründen abgebrochen werden mußten und dann nur behelfsmäßig weitergeführt werden konnten. Dennoch scheint mir eine Veröffentlichung gerechtfertigt, da immerhin neue Erkenntnisse gewonnen wurden und außerdem inzwischen erschienene Arbeiten anderer Autoren [7, 8, 16, 23, 24] und einige der hier mitzuteilenden Ergebnisse sich gegenseitig ergänzen und bestätigen.

Hermetisch verschlossene Kulturen.

Schon durch die Art und Weise, wie allgemein Mikroorganismen in einer Nährlösung gezüchtet werden, lassen sich drei Klimafaktoren, deren Änderung zum Teil auch heute noch als Ursache für das in Frage stehende wetterabhängige Verhalten der Lebewesen angesehen wird, von vornherein ausschließen. In den Nährmedien im Thermostaten bleiben Temperatur und Feuchtigkeit unabhängig von der Außenluft einigermaßen konstant, und durch den dichten Wattestopfen, mit dem die Kulturgefäße verschlossen werden, können die sogenannten Luftionen nicht in den Lebensraum der Bakterien eindringen. Ferner kommen hier Magnetismus und elektrisches Potentialgefälle zwischen Atmosphäre und Erde [25] kaum in Betracht und ließen sich überdies durch entsprechende Anordnungen ausschließen [2].

Aber einige der bekannteren Wetterfaktoren blieben dann immer noch zu prüfen, ehe mit größerer Wahrscheinlichkeit auf Strahlung als Ursache geschlossen werden konnte, nämlich Änderungen im Luftdruck und Änderungen in der chemischen Zusammensetzung der Luft. Diese Faktoren galt es nunmehr ebenfalls vom Lebensraum des Versuchsobjektes fernzuhalten, damit ihre Bedeutung für das Problem klar gestellt werden konnte.

Als Objekt für entsprechende Versuche diente *Pseudomonas tumefaciens*, dessen jugendliche, lebhaft bewegliche Stäbchen sich vor und bei Hochdruckwetter zu sternförmigen Gruppen zusammenlegen, bei Tiefdruckwetter dagegen nicht oder nur undeutlich. Über dieses Verhalten von *Pseudomonas tumefaciens* wurde schon berichtet [38].

Es war nun eine Versuchstechnik auszuarbeiten, mit deren Hilfe es gelingen mußte, das Bakterium in einem zugeschmolzenen Glasgefäß 24 Stunden bei 29° C¹ vorzuzüchten und dann, ohne dieses Gefäß zu öffnen, die jungen, schwärmenden Bakterien in eine andere Nährlösung im gleichen Kulturraum zu verimpfen, in welcher dann nach weiteren 24 Stunden der Grad der „Sternbildung“ nach Öffnen des Gefäßes mikroskopisch ermittelt werden konnte. So würden die Bakterien in den zugeschmolzenen Gefäßen während der ganzen Vorzüchtung und Hauptversuchszeit von jeglichen Änderungen im Druck und in der chemischen Zusammensetzung der Luft unbeeinflusst bleiben. Ein Vergleich mit offen gehaltenen, sonst aber genau so behandelten Kulturen mußte die Beantwortung der gestellten Frage ermöglichen².

Die „Sterne“ der Bakterien bilden sich im sogenannten Eisen-Mangan-Möhrensaft, dessen Zusammensetzung in einer früheren Mitteilung beschrieben ist [38]. Zwecks Gewinnung von Schwärmern mußten die Bakterien in Bouillon vorgezüchtet werden, von der wegen ihres hohen Stickstoffgehalts möglichst wenig beim Überimpfen in den Möhrensaft gelangen

¹ Bei dieser Temperatur wurden alle Versuche durchgeführt, wenn nicht ausdrücklich etwas anderes erwähnt ist.

² Über das Ergebnis dieser Versuche ist summarisch bereits berichtet worden [5]. Es ist aber nötig, daß sie in diesem Zusammenhang noch einmal, und zwar ausführlich Erwähnung finden.

durfte. Dieser wiederum mußte in hoher Schicht vorliegen, weil nur unter dieser Bedingung schnell und reichlich „Sterne“ gebildet werden. Dabei durfte die Oberfläche dieser Flüssigkeit nur klein sein, weil andernfalls der Sauerstoff des nicht beliebig groß ausführbaren Kulturgefäßes für die streng aeroben Bakterien nicht ausgereicht hätte.

Aus allen diesen Erwägungen heraus ergab sich die in Abb. 1 dargestellte Konstruktion des Kulturkolbens. Nach Sterilisation des bei M mit Möhrensaft beschickten und zunächst noch oben offenen, mit einem Wattebausch verschlossenen Gefäßes wurde die nasenförmige Ausbuchtung N mit ein paar Tropfen beimpfter Bouillon gefüllt und dann der Kolben bei S zugeschmolzen. Der 1 l fassende Raum L enthielt genügend Sauerstoffvorrat. Nach 24 Stunden Bebrütung gelangten die in N angewachsenen jungen Bakterien durch entsprechendes Neigen des Gefäßes nach M in den Möhrensaft. Nach weiteren 24 Stunden konnte dann nach Abscheiden des Kolbenhalses unterhalb S etwas von dem an der Oberfläche des Möhrensafte entstandenen bakterienhaltigen Schleims mit einer Öse entnommen, ausgestrichen, mit wässrigem Methylenblau gefärbt und mikroskopisch untersucht werden. Menge und Größe der Bakteriensterne wurden in Zahlen von 0 bis 5 bewertet.

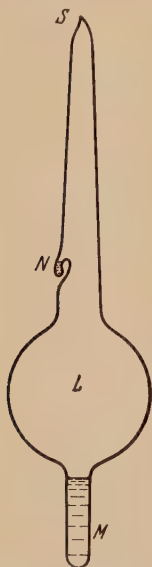


Abb. 1. Gefäß zur Züchtung von Bakterien unter Abschluß von der Außenluft. Erläuterung im Text.

Als meteorologische Vergleichsgröße wurde wie früher so auch hier die Luftdruckverteilung zu den biologischen Reaktionen in Beziehung gesetzt, d. h. die Lage des Versuchsortes zu den Hoch- und Tiefdruckgebieten, also etwa im zentralen Bereich eines Tiefs (T), in dessen innerem (TR) und äußerem (RT) Randgebiet sowie in der indifferenten Randzone (R), in dem äußeren (RH) und inneren (HR) Randgebiet eines Hochs und in dessen zentralem Bereich (H).

Dieses Verfahren befriedigt insofern nicht, als das zu ergründende wirksame Agens in dem sehr viel umschließenden Begriff der Luftdruckgebiete nicht genau erfaßt wird. Beispielsweise kann schon die aus der von mir gewählten Darstellungsart nicht ersichtliche Lage des Versuchsortes auf der Ost- oder Westseite einer Depression von entscheidender Bedeutung sein. FLOHN [17] lehnt denn auch dieses Verfahren ab. Aber die Wahl einer enger umschriebenen Bezugsgröße, etwa der Fronten, hätte daran nicht viel ändern können, weil sie selbst auch nicht das gesuchte Prinzip darstellen [1]. In keinem Falle kann also erwartet werden, daß die Übereinstimmung zwischen Wetterverlauf und biologischen Vorgängen vollkommen ist. Vielmehr handelt es sich vorläufig nur um die Aufdeckung von Regeln, nicht von Gesetzmäßigkeiten.

Um so überraschender ist die sehr gute Korrelation zwischen der Wetterdynamik und der „Stern“- oder Rosettenbildung von *Pseudomonas tumefaciens*, wie sie aus der graphischen Darstellung in Abb. 2 hervorgeht. Aus ihr ist ferner ersichtlich, daß das grundsätzliche Verhalten der Bakterien gegenüber dem Wetterverlauf unverändert bestehen bleibt, wenn die Bakterien von der Außenwelt durch eine Glaswand hermetisch getrennt sind. Während der Entwicklungszeit der

Bakterien war die Temperatur in ihrem Lebensraum konstant, und die Veränderungen des Druckes sowie der chemischen Zusammensetzung des eingeschlossenen Luftraumes waren immer ungefähr die gleichen und anders als die entsprechenden Veränderungen der Außenluft. Fol-

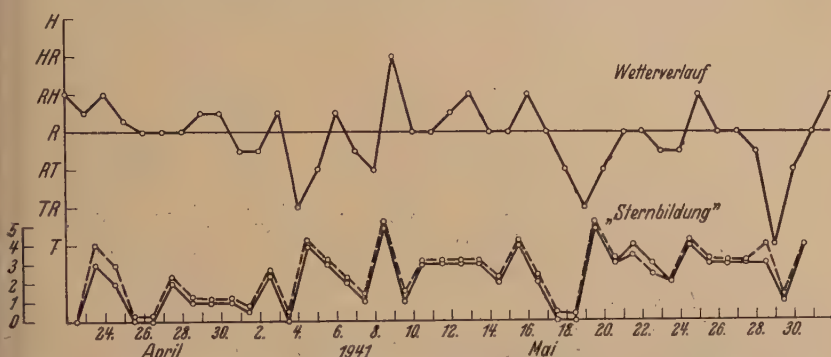


Abb. 2. Die „Sternbildung“ von *Pseudomonas tumefaciens* in offenen (—) und hermetisch verschlossenen (---) Kulturen im Vergleich mit dem Wetterverlauf.

lich können weder Druck noch chemische Zusammensetzung der Atmosphäre für das wechselnde wettergebundene Verhalten der Bakterien verantwortlich gemacht werden.

Abschirmung von Strahlungen.

Nach diesen Versuchen blieb ernstlich nur noch Strahlung als Ursache für die ungeklärte Wetterabhängigkeit der Organismen in Erwägung zu ziehen. Da auch B. und T. DÜLL [10, 11, 12] auf Grund statistischer Untersuchungen zur Überzeugung gekommen waren, daß die Ursache für den Gleichklang zwischen biologischen und meteorologischen Vorgängen in einer solaren Strahlung zu suchen sei, schien es erfolgversprechend, diese Frage mit Mikroorganismen als besonders geeigneten Versuchsobjekten nun auch experimentell zu beantworten. Mit zwei verschiedenen starken Panzern wurde das Ziel verfolgt, die Versuchsorganismen gegen die angenommene wirksame Strahlung vollständig abzuschirmen. Im Falle dieses gelang, mußten sich die untersuchten Bakterien bei wechselndem Wetter stets gleich verhalten, entweder immer gleichmäßig schlecht oder gleichmäßig gut gedeihen, je nachdem die gesuchte Strahlung die Lebensfunktionen der Zelle hemmte oder begünstigte. Die Untersuchungen haben dann aber sehr bald gezeigt, daß die Verhältnisse wesentlich verwickelter liegen und das gesteckte Ziel mit den erwähnten Mitteln nicht in vollem Umfang erreicht werden konnte.

Als leichte Panzerung dienten zylindrische Bleigefäße von 24 mm Wandstärke mit übergreifendem Deckel und etwa 1000 ccm Inhalt, die in einem Brutraum im Keller der Biologischen Reichsanstalt aufgestellt waren. Um noch härtere Strahlen abschirmen zu können, wurde im Institut für Höhen-

strahlenforschung in Berlin-Dahlem³ aus Barren und Platten von Blei und Eisen ein Panzer in der in Abb. 3 dargestellten Form gepackt. Er ruhte auf einer 75 mm dicken Lage von Eisenplatten, welche zur Abschirmung der verhältnismäßig schwachen Bodenstrahlung als ausreichend angesehen wurde. Infolge der Barrenschichtung ergab sich ein fast würfelförmiger Bau und demgemäß die größte Wandstärke in etwa 45° von Bodenmitte aufwärts,

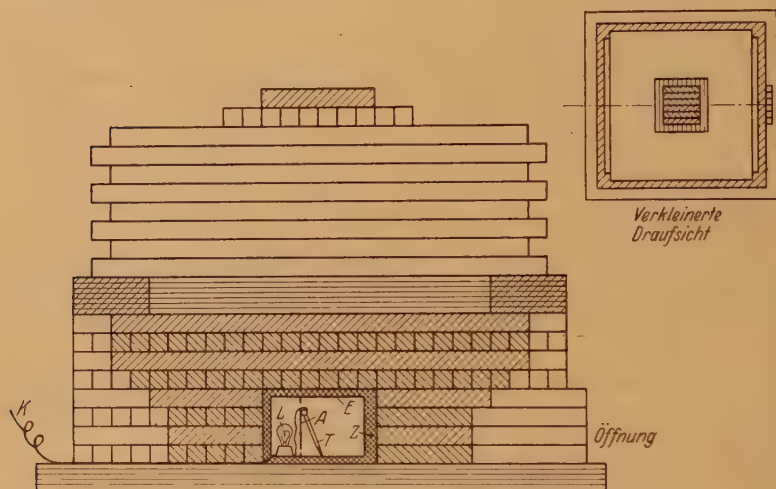


Abb. 3. Längsschnitt durch den großen Panzer. Schraffierte Barren und Platten aus Blei, nicht schraffierte aus Eisen. Erläuterung im Text.

aus welcher Richtung die stärkste Einstrahlung zu erwarten war. In der Horizontalen und in der Senkrechten bestanden die Wände aus etwa 25 cm Blei und darüber etwa 45 cm Eisen. Der Innenraum aus einem Kasten von dünnem Eisenblech E, 30 cm tief, 23 cm breit und 16 cm hoch, war zwecks Wärmeisolierung mit einer Zellstoffschicht Z umkleidet. Als selbsttätig regulierbare Heizquelle war eine gegen den übrigen Brutraum durch Asbestpappe A abgeschirmte Glühbirne L mit Kontaktthermometer T eingebaut und dieses auf eine Bruttemperatur von 29° C eingestellt, die während der Versuchszeit konstant blieb. Das Kabel K war auf dem Boden nach außen verlegt. Der Zugang zum Innenraum des Panzers war durch eine dickere Zellstoffschicht und durch Blei- und Eisenbarren versperrt, die beim Auswechseln der Kulturen jeweils aus- und wieder eingebaut wurden.

In diesem Panzer wurden gleichzeitig drei Bakterienarten auf ihr Verhalten untersucht, in dem leichteren Bleipanzer wegen des beschränkten Raumes nur zwei von ihnen. Zum Vergleich mit Kontrollen im gewöhnlichen Brutschrank wurde wiederum die „Sternbildung“ von *Pseudomonas tumefaciens* als Test herangezogen, ferner die Zelllänge von *Spirillum volutans* und außerdem nur im großen Panzer und in der

³ Dem leider verstorbenen, damaligen Direktor des Institutes, Herrn Professor Dr. KOLBÖRSTER, bin ich für seine Gastfreundschaft und seine wertvollen Ratschläge bei diesen Arbeiten zu großem Dank verpflichtet.

Kontrolle die Menge des von *Azotobacter chroococcum* gebundenen Stickstoffs bestimmt.

Theorie der Wetterstrahlung.

Betrachten wir zunächst die Kurven der „Sternbildung“ von *Pseudomonas tumefaciens* im Juni 1942: Wie die Abb. 4 zeigt, verlaufen sie insgesamt so, daß eine gewisse Ähnlichkeit mit der Wetterkurve zwar nicht sehr deutlich, aber doch immerhin zu erkennen ist. Stellenweise verlaufen sie auch unter sich ziemlich parallel. An anderen Tagen aber, so vom 11.—14., vom 17.—20. und vom 24.—27., ist der Gang mehr oder weniger gegensätzlich. Als besonders hervorstechend wäre ferner noch zu erwähnen, daß die „Sternbildung“ in der Kontrolle und hinter der schwächeren Panzerung durchschnittlich besser war als hinter der starken Panzerung. Über die Julikurven (Abb. 5) wäre im wesentlichen dasselbe zu sagen mit dem Unterschied allerdings, daß sie meistens niedriger liegen als im Juni, was durchaus dem an Tiefdruck reicheren Wetter entspricht.

Wenn man nun als Ursache für das wettergebundene Verhalten der Bakterien irgendeine Strahlung annimmt, wozu eine gewisse vorläufige Berechtigung in dem unterschiedlichen Verlauf der Kontroll- und Panzerkurven gegeben ist, dann muß diese Strahlung auch zum Wetter in irgendeiner Beziehung stehen. Darum soll sie hier vorläufig als Wetterstrahlung bezeichnet werden. Sie scheint mit einem Teil der Höhenstrahlung oder besser ihrer Folgestrahlungen identisch zu sein [26]. Die Höhenstrahlung vermag nach GEIGER [19] drei verschiedene Gruppen von Schauern zu bilden. Das sind dicht gebündelte Strahlen von geringerer Durchdringungskraft, die durch Stoß- und Zertrümmerungsprozesse beim Auftreffen vornehmlich schwerer und schneller Teilchen wie Mesotronen, Neutronen und Protonen auf Atomkerne entstehen, während es sich bei der aus dem Kosmos oder von der Sonne kommenden Primärstrahlung wahrscheinlich um sehr energiereiche, schnelle Elektronen oder Protonen handelt. Von den verschiedenen Schauern, die vielleicht der biologisch wirksamen Wetterstrahlung ähnlich oder mit ihr identisch sind, bestehen die hinter dünnen Metallschichten beobachteten aus 5 bis 50 Strahlen. Solche Schauer können z. B. in einem kupfernen Brutschrank auftreten. Hinter dicken Metallschichten von mehreren Zentimetern sind die Schauer wesentlich strahlenreicher, weil sie durch viel energiereichere Teilchen ausgelöst werden. Solche „HOFFMANNSCHE Stöße“ genannte Schauer sind wahrscheinlich in dem großen Panzer zur Wirkung gekommen. Die von GEIGER als die merkwürdigste bezeichnete Gruppe, die der atmosphärischen Schauer, über die erst wenig bekannt ist, wird vermutlich ebenfalls biologisch wirksame Strahlung umschließen und kann z. T. außerordentlich strahlenreich sein (etwa 100 000 Strahlen).

Auch die biologisch wirksame Strahlung wird wie die Schauerstrahlung verhältnismäßig weich sein, so daß sie von den Zellen ab-

sorbiert werden kann oder doch mindestens diese nicht ohne wesentliche Energieeinbuße durchschlägt. Nimmt man ferner an, daß diese weiche Strahlung die „Sternbildung“ hemmt — und das dürfte wohl die nächstliegende Annahme sein —, dann muß sie vor und in einem Tiefdruckgebiet vorherrschen. Wir wollen sie deshalb kurz T-Strahlung nennen.

Sie wird natürlich schon von leichteren Panzern wie den hier verwendeten Bleigefäßen mehr oder weniger abgeschirmt. Später noch zu erwähnende Versuche werden zeigen, welche Schichtdicke von Metall oder weniger dichter Materie hierfür unter Umständen ausreichen kann. Jedenfalls ist zu beachten, daß die Kontrollen der genannten und vorerst folgenden Versuche unter dem Einfluß einer Strahlung standen, wie sie hinter den Metallwänden des Thermostaten und nicht wie sie in der freien Atmosphäre herrschte.

Gäbe es auf der Erde nur diese eine an das Wetter gebundene und biologisch wirksame, unsichtbare Strahlung, die relativ weiche T-Strahlung, dann müßten die durch sie gehemmten Lebensvorgänge hinter einer einigermaßen starken Panzerung unbeeinflußt durch die Strahlung mit stets gleicher, und zwar größter Intensität und in gleichbleibender Weise ablaufen.

Das ist aber nicht der Fall, wie die Versuche mit der verschiedenen Panzerung lehren. Im schweren Panzer ist ferner die „Sternbildung“ durchschnittlich schlechter als in der Kontrolle. Deshalb ist anzunehmen, daß in der gesamten Wetterstrahlung auch sehr harte Bestandteile vorkommen müssen, die beim Durchschlagen dichter Materie (Blei und Eisen) zahlreiche Schauer weicherer Strahlung erzeugen. Diese energiereichere, harte Strahlung ist offenbar bei Hochdruckwetterlagen vorherrschend und scheint oft auf der Vorderseite des Tiefs, wenn die T-Strahlung am stärksten ist, mehr oder weniger zu fehlen. Der durchdringende Anteil der Wetterstrahlung sei deshalb als H-Strahlung bezeichnet. Sie selbst wird vielleicht wegen ihrer großen Durchdringungsfähigkeit biologisch unwirksam sein, könnte aber andererseits dennoch vielleicht eine solche Wirkung entfalten, etwa über eine Ionisierung und Aktivierung der Gase der Luft, insbesondere des Sauerstoffs.

Die hypothetischen H- und T-Strahlen können jedoch nicht zwei elementare Strahlungsarten von genau festliegendem, konstantem Energiegehalt sein, die ohne Übergang getrennt nebeneinander bestehen. Sie können nicht nur aus Teilchen verschiedener Geschwindigkeit, sondern auch aus solchen verschiedener Masse und verschiedener elektrischer Ladung zusammengesetzt sein. Auch liegt kein Grund vor zur Annahme, daß die H-Strahlung nicht noch wesentlich härtere Anteile enthält, die bei Verwendung noch stärkerer Panzer erkennbar werden müßten. Die Versuchsergebnisse im 24 mm-Bleipanzer haben gezeigt, daß die hier auftretende weiche Strahlung durchschnittlich nicht so intensiv wirksam ist wie diejenige im großen Panzer. Durch die 24 mm starke Bleiwand wurden offenbar noch mehr Teilchen ab-

sorbiert oder ohne Einbuße durchgelassen, als in T-Strahlen umgewandelt. Man geht deshalb wohl nicht fehl in der Annahme, daß Strahlen verschiedenster Art von größter Durchdringungsfähigkeit bis zu den allerweichsten auf der Erdoberfläche auftreten, wie das von der Höhenstrahlung bekannt ist, allerdings zeitlich so verteilt, daß vermutlich die härteren, energiereicheren H-Strahlen bei entstehendem Hochdruckwetter vorherrschen, die weicheren, energieärmeren T-Strahlen dagegen bei entstehendem Tiefdruckwetter.

Wie weit diese Theorie der Wetterstrahlung, die selbstverständlich vorerst nur als Arbeitshypothese gewertet werden soll, die einzelnen Versuchsergebnisse zwanglos zu deuten vermag, soll im folgenden untersucht werden.

Pseudomonas tumefaciens.

Schon in der Tatsache, daß die „Sternbildung“ von *Pseudomonas tumefaciens* (Abb. 4) vor allem im Juni hinter der schweren Panzerung durchschnittlich schwächer war als hinter der leichten Panzerung und in der Kontrolle, läßt sich ein Hinweis auf die Strahlennatur des wirk-samen Agens erblicken. Anfangs, bis etwa zum 11. 6., verlaufen alle drei

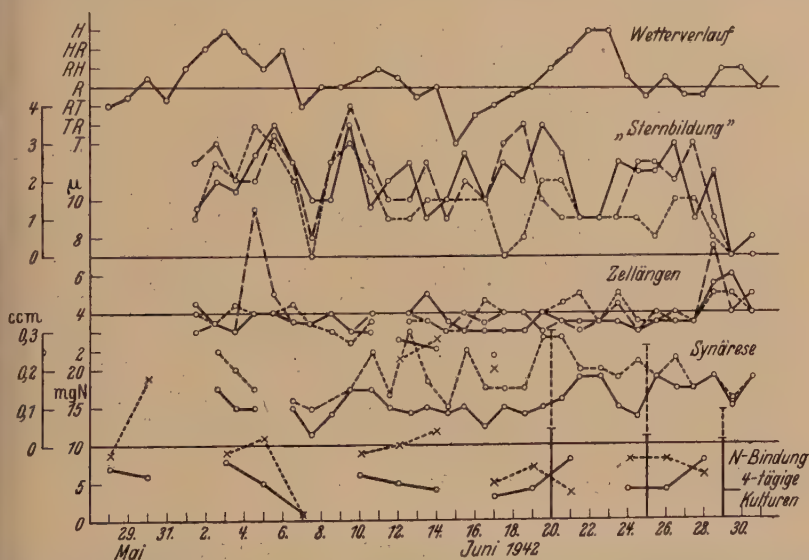


Abb. 4. „Sternbildung“ von *Pseudomonas tumefaciens*, Zelllängen von *Spirillum volutans*, N-Bindung von *Azotobacter chroococcum* und Agar-Synärese im kupfernen Brutschrank (—), im leichten (---) und im schweren (-.-) Panzer, verglichen mit dem Wetterverlauf.

Kurven ungefähr parallel zueinander und ebenso zur Wetterkurve. Manchmal liegt die eine, manchmal die andere nur etwas höher oder tiefer. Das würde heißen, daß weiche, mittlere und harte Strahlung in gleicher Weise mit dem Wetterverlauf schwächer oder stärker werden.

Die Gipfel aller drei Kurven liegen vor und in Hochdruckgebieten. Hier erreichen also alle drei Strahlungsgruppen Minimalwerte, und umgekehrt erreichen sie Maximalwerte vor und in Tiefdruckgebieten. Wir sehen also, daß anscheinend auch die gesamte Wetterstrahlung vor Depressionen stärker werden kann, nicht nur die weiche T-Strahlung.

Im weiteren Verlauf des Monats zeigen sich dann aber offensichtliche Gegensätze zwischen der Kontrolle und den Panzerkurven. Diese sinken zwischen dem 11. und 13. ab, während die Kontrollkurve ansteigt, entsprechend dem kurzen Anstieg der Wetterkurve am 14. Daß die Kurve des schweren Panzers noch tiefer absinkt als diejenige des einfachen Bleipanzers, entspricht der allgemein stärkeren T-Strahlung im schweren Panzer (strahlenreichere Schauer). Dann folgt der tiefste Punkt der Kontrollkurve, während die beiden anderen wieder ansteigen. Unmittelbar vor dem Tief ist also die T-Strahlung stärker als die mittlere und sehr harte H-Strahlung.

Bei dem nun folgenden Anstieg der Wetterkurve aus dem Tief am 15. bis zum Hoch am 22. und 23. steigt auch die Kontrollkurve der „Sternbildung“ mit kurzen Rückschlägen an bis zum 20., nimmt also die T-Strahlung entsprechend ab. Die mittlere Strahlung verhält sich ähnlich, erreicht aber ihren geringsten Wert schon am 18. und 19., zu welcher Zeit die extrem harte H-Strahlung gewissermaßen als Vorzeichen des kommenden Hochs sehr stark wird.

Am 20., am vorderen Rande der Antizyklone, ist sowohl die T- als auch die H-Strahlung verhältnismäßig schwach. Nur die mittlere Strahlung nimmt schon wieder zu bis zu dem Wert, den mitten im Hoch dann auch die T- wie die sehr harte H-Strahlung erreichen. Dem entspricht ein steiler Abfall der Wetterkurve, der jedoch zwischen dem 25. und 26. wieder abgebremst wird, entsprechend einer Abnahme der T-Strahlung bereits am 24., der mittleren am 25. und einer Verstärkung der H-Strahlung am 26. Hier sehen wir ein ähnliches Auseinanderstreben der Kurven wie zwischen dem 17. und 21. Also ändert sich nicht nur die Intensität der gesamten Strahlung mit dem Wetter wie etwa im ersten Teil des Juni, sondern auch ihre Zusammensetzung. Vorläufig ist darin allerdings nur die Regel zu erkennen, daß die härteren Anteile vor Antizyklonen und die weicheren vor Zyklonen überwiegen.

Am 27. senkt sich die Wetterkurve wieder etwas, und die T-Strahlung nimmt zu und die H-Strahlung ab. Aber schon am übernächsten Tage steigt die Wetterkurve abermals an, wie auch die T-Strahlung wieder abnimmt und mittlere sowie extrem harte Strahlung zunehmen. Bis dahin wäre alles in Übereinstimmung mit der Theorie. Aber dann fällt auch die Kontrollkurve bis auf den 0-Punkt, was einer sehr starken Zunahme der T-Strahlung entspricht, obwohl die Wetterkurve auf der erreichten Höhe bleibt. Hier kann es sich nicht um die Wirkung eines Versuchsfehlers handeln, weil die „Sternbildung“ unter

allen drei Versuchsbedingungen gleich 0 war und sich andere Objekte ebenso geschwächt zeigten.

Die besondere Eigenart des Wetters dieser Tage ist wohl in der Lage Berlins zwischen einem starken östlichen Tief und einem westlichen Hoch zu suchen und spiegelt sich in einem damals angefertigten Vermerk, besonders auch, was das Befinden der im Laboratorium arbeitenden Menschen betraf. Für jene Zeit wurde ein schroffer Wechsel verzeichnet zwischen Eintrübung des Himmels am Tage, begleitet von mehr oder weniger starkem Müdigkeitsempfinden der Menschen und nur kurz dauerndem Aufklaren am Abend, begleitet von deutlicher Belebung der Menschen wie der Bakterien, aber auch von katarrhalischen Erkrankungen der Atemwege und des Darms. Desgleichen trat damals eine *Botrytis*-Fäule an Erdbeeren epidemisch auf, obwohl es nicht regnete. Das alles kann mit der aufgestellten Theorie offenbar nur so gedeutet werden, daß in der Versuchszeit von 24 Stunden sowohl eine sehr starke T-Strahlung als auch eine sehr starke H-Strahlung in raschem Wechsel zur Wirkung kamen.

Im Monat Juli (Abb. 5) läßt sich am Verlauf der „Sternbildung“ fast noch besser zeigen, daß vor einem Hoch entweder die Gesamtstrahlung sehr schwach oder nur die harte H-Strahlung intensiv ist.

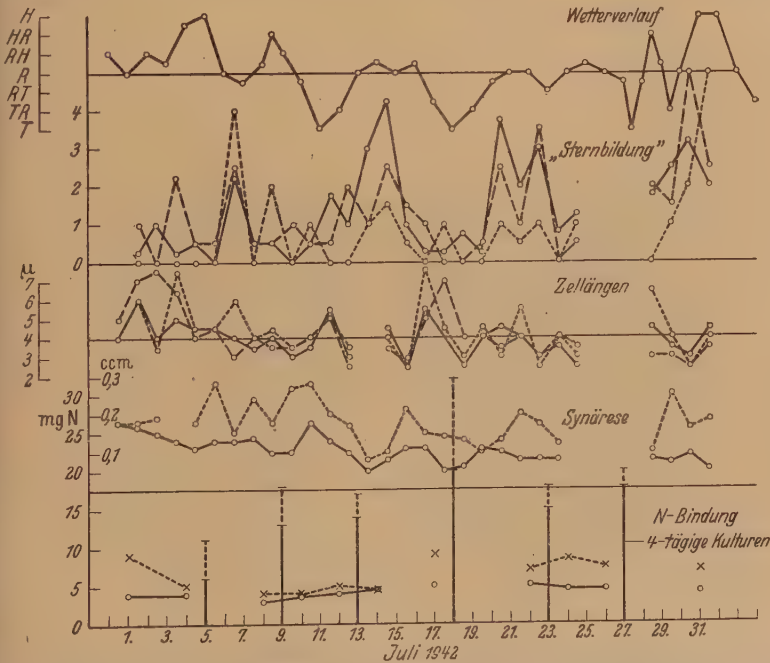


Abb. 5. „Sternbildung“ von *Pseudomonas tumefaciens*, Zellängen von *Spirillum volutans*, N-Bindung von *Azotobacter chroococcum* und Agar-Synärese im kupfernen Brutschrank (—), im leichten (---) und im schweren (----) Panzer, verglichen mit dem Wetterverlauf.

Der erste Hochdruckgipfel zu Beginn des Monats wird nur durch die mittelstarke Strahlung angezeigt. Dem sehr kurz dauernden, aber sehr

steilen Anstieg der Wetterkurve zwischen dem 8. und 9. entspricht dagegen der Gipfel aller drei „Sternkurven“ zwischen dem 6. und 7., also einer vorübergehenden, aber deutlichen Schwächung der gesamten Strahlung. Der Depression am 11. geht eine Schwächung der harten H-Strahlung am 9. voraus sowie eine Verstärkung der T-Strahlung. Zum weiteren Kurvenverlauf ist nichts Besonderes zu sagen. Im großen und ganzen wechseln Täler und Gipfel, das heißt also Zu- und Abnahme der gesamten Wetterstrahlung mit dem Kommen und Gehen der Depressionen. Dabei scheint fast durchweg die weiche T-Strahlung relativ am schwächsten wirksam zu sein, die mittlere stärker und die extrem harte H-Strahlung am stärksten entsprechend dem Strahlenreichtum der Schauer hinter dünnen und dicken Metallpanzern. Nur vor und in den meistens von Westen heranziehenden Tiefdruckgebieten ist dieses Verhältnis zuweilen umgekehrt. Dann wird vermutlich die T-Strahlung besonders dicht sein.

Erwähnung verdienen dann schließlich noch die Kurvenstücke am Ende des Monats Juli, weil sie sich besonders gut mit Hilfe der gegebenen Theorie deuten lassen. Vom 28. bis 29. erleben wir einen vorübergehenden barometrischen Anstieg vom Tiefrand bis weit in ein Hoch mit nachfolgendem Abfall bis wieder in ein Tief hinein, das aber ebenfalls sehr schnell vorübergeht und von einem zwei Tage anhaltenden Hoch bis zum 1. 8. abgelöst wird. So wie das Wetter mit der anfänglichen Unterbrechung vom 29. bis 30. auf dieses Hoch hinstrebt, so auch die „Sternbildung“ und die hypothetische Zusammensetzung der Wetterstrahlung. Vom 28. bis zum 29. ist die „Sternbildung“ in der Kontrolle und im Bleigefäß mittelgut, im großen Panzer aber gleich 0. Schon hier können wir also intensivste harte H-Strahlung annehmen, die auf das kommende Hoch hindeutet. Die extrem weiche Strahlung scheint dagegen noch nicht entsprechend geringfügig zu sein, weil sich offenbar das flüchtige Tief darin noch zu erkennen gibt. Am folgenden Tage ist die mittlere Strahlung sogar noch etwas stärker, während die immer noch stärkste harte H-Strahlung offenbar etwas schwächer geworden ist. Aber auch die T-Strahlung hat, wie die Kontrollkulturen zeigen, der Theorie entsprechend abgenommen und wird zum nächsten Tage noch schwächer, weil sich das Hoch nun gefestigt hat. Zu dieser Zeit erreicht die mittlere Strahlung im Bleigefäß ihren schwächsten und diejenige im großen Panzer einen mittleren Wert. Noch einen Tag später nimmt die weiche Strahlung in den Kontrollkulturen wie auch die im Bleigefäß schon wieder deutlich zu. Die Strahlung im großen Panzer dagegen erreicht jetzt die schwächste Wirkung. Die „Sternbildung“ ist hier so gut, wie sie selten festgestellt wurde. Dem entspricht ein Abfall der Wetterkurve am folgenden und übernächsten Tage.

Wir halten also nochmals fest: Hemmung der „Sternbildung“ im Panzer, in der Kontrolle aber nicht, bedeutet starke H-Strahlung, schwache T-Strahlung und kündigt Hochdruckwetter an. Umgekehrt:

wird Tiefdruckwetter angezeigt durch Hemmung der „Sternbildung“ in der Kontrolle, nicht im Panzer, das heißt durch starke T-Strahlung und schwache H-Strahlung. Außerdem kann auch die Gesamtwetterstrahlung vor einem Tief stark und vor einem Hoch schwach sein. Diese aus den bisherigen Feststellungen abgeleitete Grundregel soll im folgenden an einem anderen Versuchsobjekt auf ihre allgemeinere Gültigkeit untersucht werden.

Spirillum volutans.

Gelegentlich früherer Versuche [4] konnte beobachtet werden, daß nicht nur die Schwärmfreudigkeit des großen *Spirillum volutans* sehr wesentlich vom Wetterfaktor, der nunmehr angenommenen Wetterstrahlung, beeinflußt wird, sondern auch seine Zelllänge. Diese läßt sich in mit wässrigem Methylenblau gefärbten Ausstrichen bequem messen und bietet somit eine Handhabe, die Strahlenwirkung mit einer objektiveren Methode nachzuweisen.

Das Spirillum wurde, wie das früher [4] schon ausführlich beschrieben worden ist, 24 Stunden lang auf Bouillonagar gezüchtet und dann im Ausstrich untersucht. Die Zellgröße war zeitweilig sehr einheitlich, oft aber auch sehr uneinheitlich. In diesem Falle wurde der Durchschnitt ermittelt. Die zeitlich durch Schwankungen in der Wetterstrahlung bedingten Änderungen der Zellgröße lagen jedenfalls außerhalb der Fehlergrenze. Als keineswegs extremes Beispiel zweier derart verschiedener Ausstriche möge Abb. 6 dienen.

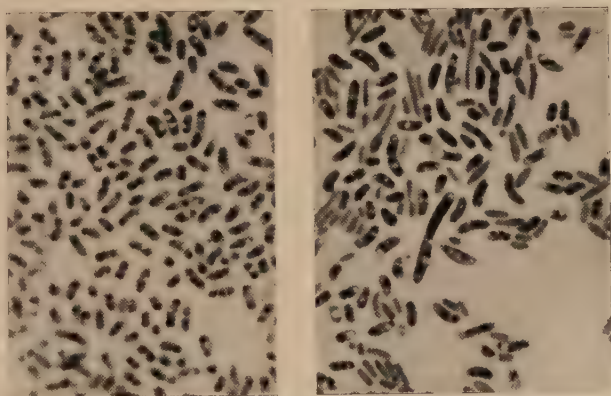


Abb. 6. *Spirillum volutans*, links Kontrolle, rechts Panzerkultur.

Die graphische Darstellung (Abb. 4 und 5) der Zellängen an den einzelnen Tagen der Versuchsmonate Juni und Juli, mit und ohne den schon erwähnten Panzerungen, zeigen zunächst einmal im Juli allgemein höhere Werte als im Juni und in den Panzern durchschnittlich höhere als in der Kontrolle, also anscheinend den gegenteiligen Befund, wie er für die „Sternbildung“ von *Pseudomonas tumefaciens* erhoben

wurde. Vielleicht wird das Wachstum der Zelle durch T-Strahlung gefördert, eine Frage, die weiter unten (S. 503 oben) nochmals gestreift werden soll.

In Abb. 6 ist aber, abgesehen von den verschiedenen Zellängen, offenbar auch eine gewisse Schädigung der Panzerkultur an der abnormen Gestalt mancher Zellen zu erkennen. Beide Kulturen, Kontrolle und Panzer, stammen vom 24. 4. 1942, als Berlin am Rande einer skandinavischen Antizyklone lag. Hier haben sich also vermutlich nur schwache Schauer weicher Strahlung im Panzer auswirken können, da die H-Strahlung außerhalb desselben nicht stark gewesen sein kann. Deshalb haben auch die Zellängen jener Panzerkultur kaum die Hälfte der später verschiedentlich festgestellten hohen Werte erreicht.

Im Juni (Abb. 4) sinkt die Wetterkurve nur einmal bis an den Rand und einmal bis in die Mitte einer Depression. Meistens bleibt sie über der Mittellinie R. Dem entsprechend bleibt auch die Zellänge der Spirillen fast immer unter dem mittleren Wert von 4μ . Nur vor dem ersten Tief-Randgebiet am 7., vielleicht aber auch zur vorhergehenden Verstärkung des Hochs am 6. gehörig, nämlich vom 4. bis 6., erhebt sich die Kurve der Bleipanzerung, also laut Theorie diejenige der mittelharten Strahlung, bis zur Höhe von $9,5\mu$. Daß hier die Zellen der Kontrollen nicht auch ins Riesenhafte angewachsen sind, ist vermutlich damit zu erklären, daß die Gesamtstrahlung der östlichen Lage des Tiefs und dem vorübergehenden Anstieg der Wetterkurve am 6. entsprechend, zu wenig T-Strahlen, wohl aber genügend Anteile mittlerer harter Strahlung enthielt. Diese haben hinter 24 mm Blei ausreichend Intensitäten einer weichen Strahlung erzeugt, durch welche wohl, wie es scheint, das Längenwachstum der Spirillen stark gefördert oder ihr Zellteilung entsprechend behindert, die „Sternbildung“ aber nur schwach beeinträchtigt wurde.

Vor dem ausgeprägten und bezeichnenderweise von Westen heranziehenden Tief am 15. werden dann die Spirillen in den Kontrollkulturen ungewöhnlich lang. Sonst steigt über die 4μ -Linie zu wiederholten Malen nur die Kurve der stark gepanzerten Kulturen, eine Erscheinung, die schon im Kapitel über die „Sternbildung“ besprochen wurde. Sie erklärt sich ganz einfach dadurch, daß im Juni überwiegend Hochdruckwetter herrschte und die sehr energiereiche, auch bei solchem Wetter anhaltende H-Strahlung im Panzer reichlich Schauer von wirksamer weicher Strahlung erzeugte. Die äußerst energiereichen Teilchen der H-Strahlung, welche in eine so dichte Panzerung noch eindringen, treffen an der Erdoberfläche, wie es scheint, nur mehr vereinzelt auf. Daran mag es liegen, daß die Panzerkurven oft so unruhig, stoßweis verlaufen und auch Parallelkulturen manchmal größere Abweichungen aufweisen.

Am Ende des Monats erleben wir abermals, genau so wie bei *Pseudomonas tumefaciens* (Abb. 4), eine deutliche Beeinflussung durch T- und H-Strahlung, obwohl nach den Wetterkarten Berlin damals im äußeren

Wirkungsbereich eines Hochs lag. Eine Erklärung hierfür wurde bereits oben gegeben.

Die Langzelligkeit der Spirillen in den Kontrollkulturen hält auch im Monat Juli zunächst noch an, um erst ganz allmählich abzuklingen und etwa am 7. wieder Normalwerte zu erreichen, genau so wie die „Sternbildung“ bis dahin sehr schwach ist. Trotz der nahen Hochdruckgebiete muß in dieser Zeit eine starke T-Strahlung stattgefunden haben, wie das auch aus den bei Besprechung von Abb. 4 schon erwähnten sonstigen Beobachtungen hervorgeht. Die H-Strahlung war hin und wieder ebenfalls überdurchschnittlich stark, womit die Verbindung zu den Hochdruckgebieten hergestellt ist. In der Zeit von Ende Juni bis Anfang August liegt jährlich die dichteste Häufung sowohl von antizyklonalen als auch zyklonalen kalendermäßig gebundenen typischen Wetterlagen, sogenannten Singularitäten [18]. Ebenso fallen die überwiegenden Hochdrucktypen von Februar bis Juni und von September bis Oktober zeitlich mit den Perioden geringster Hemmung biologischer Reaktionen zusammen und die überwiegenden Tiefdrucktypen von November bis Januar mit der Periode stärkster Hemmung. Auch in dieser Hinsicht ist also die Übereinstimmung zwischen biologischen und meteorologischen Befunden recht gut.

Außergewöhnlich ist das verspätete Auftreten des Gipfels in allen drei Kurven unmittelbar nach der Depressionsmitte am 11., während das nächste Tief am 18. wie üblich schon ein bis zwei Tage vorher durch besonders große Spirillenformen in ungepanzerten wie gepanzerten Kulturen angezeigt wird.

Eine weitere Bestätigung der Befunde an *Pseudomonas tumefaciens* liefern die drei Kurvenstücke am Ende des Monats Juli. So wie die Kurven der „Sternbildung“ zunächst aus der Tiefe bis zu großen Höhen ansteigen, um dann wieder abzusinken, fallen umgekehrt die Spirillenkurven von überdurchschnittlichen bis zu sehr niedrigen Werten, um dann wieder anzusteigen. Nur die Kurve des Bleipanzers verläuft hier mehr horizontal.

Überhaupt ist festzustellen, daß zwar im großen und ganzen die Strahlung unter den drei verschiedenen Versuchsbedingungen die „Sternbildung“ von *Pseudomonas tumefaciens* wie die Zelllänge von *Spirillum volutans* gleichzeitig und in regelmäßiger Weise beeinflusste, im einzelnen aber doch Abweichungen vorkommen. Zum Beispiel sind die Spirillen der Kontrolle zwischen dem 3. und 4. 6. sehr kurz, die „Sternbildung“ aber ist dort verhältnismäßig schlecht. Vom 7. zum 8. ist diese unter allen drei Bedingungen, vor allem aber in den gepanzerten Kulturen besonders schlecht, während an den Spirillen zu dieser Zeit keine übernormale Zelllänge festzustellen ist, sondern bereits drei Tage früher, und hier auch nur im Bleigefäß. Solcher Beispiele ließen sich noch mehr anführen. Sie scheinen zu beweisen, daß verschiedene biologische Reaktionen durch verschiedene Bestandteile der T-Strahlung beeinflusst werden. Das wird im folgenden noch deutlicher zum Ausdruck kommen.

Es soll hier aber auch nicht unerwähnt bleiben, daß die Zelle möglicherweise bestrebt ist, den einmal empfangenen Impuls (Langzelligkeit) auch der Nachkommenschaft so lange festzuhalten, bis sie von einer neuer, andersartigen Strahlung getroffen wird. Auf diesem Wege könnte in einer Mikrobekultur ein teilweiser Ausgleich stattfinden und auch eine Anpassung gegenüber anderen Kulturen und anderen biologischen Reaktionen. Von Vererbung kann zwar vorläufig bei Bakterien nicht gesprochen werden. Aber deshalb ist nach neuesten Untersuchungen Mutation doch durchaus möglich. Die strahleninduzierte Eigenschaft würde dann durch eine andere Strahlung auf Grund ihrer quantenförmigen Wirkungsweise nach der Treffertheorie jeweils zunächst nur bei einem Teil der Individuen wieder abändern. (Siehe auch S. 481—482!) Eine „spontane Mutabilität“ [21], ausgelöst durch Wetterstrahlung, ist sehr gut denkbar, weil Erhöhung der Mutationsrate durch Ultrastrahlenschauer nachgewiesen werden konnte [40].

Azotobacter chroococcum.

Azotobacter chroococcum, das wegen seiner stickstoffbindenden Eigenschaft schon öfter für meteorobiologische Untersuchungen Verwendung fand [2, 37], wurde in folgender synthetischer Nährlösung in 100 ccm fassender Erlenmeyerkölbechen aus Jenaer Glas Nr. 20 48 Stunden lang gezüchtet: H_2O 100,0, Glykose 2,0, $CaCO_3$ 0,1, K_2HPO_4 0,1, $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ 0,05, $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$ 0,005, $Na_2MoO_4 \cdot 2 H_2O$ 0,005. Durch Zusatz von 0,5 ccm konzentrierter reiner Schwefelsäure wurde dann die Kultur abgetötet und der gebundene Stickstoff nach KJELDAHL bestimmt. Die gefundenen Stickstoffwerte, jeweils in der Mitte der Entwicklungszeit im Koordinatensystem eingetragen, ergaben die in Abb. 4 und 5 dargestellten Kurvenstücke. Aus äußeren Gründen konnten diese Versuche nicht laufend und auch nur in der Kontrolle und im großen Panzer durchgeführt werden.

Ein Vergleich zwischen den Kontroll- und Panzerkurvenstücken zeigt schon auf den ersten Blick, daß sie sich mit nur wenigen Ausnahmen gegensätzlich verhalten. Die Stickstoffbindung nimmt in den Kontrollen mit fallender Wetterkurve ab, mit steigender zu, wie das früher schon festgestellt wurde [2, 37]. Im Panzer dagegen verhält sich das Bakterium annähernd umgekehrt. Nach der hier aufgestellten Strahlentheorie ist das auch ganz verständlich: Mit fallender Wetterkurve nimmt die schädliche T-Strahlung zu, die H-Strahlung aber und damit auch die im Panzer zur Wirkung kommende weiche Strahlung ab. Jedoch wird die Stickstoffbindung der *Azotobacter*-Zelle wahrscheinlich wieder unter dem Einfluß eines anderen Anteils der T-Strahlung stehen als die „Sternbildung“ von *Pseudomonas tumefaciens* (vgl. beispielsweise Kontrolle am 26. und Panzer am 12.) oder das Längenwachstum von *Spirillum volutans* (Kontrolle am 7. und, wenig deutlich, Panzer am 5.).

Vor allem aber kann die biologisch wirksame Strahlung im Panzer nicht nur die bislang erwähnte Art der T-Strahlung beinhalten, weswegen sonst die hier wesentlich verstärkte Stickstoffbindung nicht zu verstehen wäre, die ja in den Kontrollen vor einem Tief, also bei T-Strahlung, ebenso wie andere biologische Reaktionen gehemmt ist. In

Panzer muß also noch irgendein zumindest die Stickstoffbindung förderndes Strahlungsmoment hinzukommen, sei dieses nun qualitativer oder quantitativer Art.

Ferner ist zu beachten, daß die ermittelten Stickstoffmengen ein Abbild der gesamten Entwicklung dieses Bakteriums sind, während die „Sternbildung“ und alle anderen bisher untersuchten mikrobiologischen Reaktionen nur einen bestimmten, verhältnismäßig eng umschriebenen Ausschnitt aus der Gesamtentwicklung darstellen. Auf die Bedeutung dieses Umstandes wird später noch einzugehen sein.

Der grundsätzliche Unterschied zwischen den Kontroll- und Panzerkulturen von *Azotobacter* bleibt übrigens bestehen, wenn sie nicht zwei Tage, sondern vier Tage, bis zum Ende der Entwicklung, den verschiedenen Strahlungseinflüssen ausgesetzt bleiben. Die Unterschiede werden nur noch deutlicher (Abb. 4 und 5). Anders allerdings scheint sich *Azotobacter* zu verhalten, wenn durch Zusatz von 0,1 % Agar [29] zur sonst unveränderten Nährlösung seine Entwicklung so beschleunigt wird, daß ihr Ende schon nach zwei Tagen anstatt erst nach vier Tagen erreicht ist. Soweit das aus den nur drei Versuchen, die durchgeführt werden konnten, ersichtlich ist (12., 14. und 17. in Abb. 4), liegen die Stickstoffwerte der Kontrollkulturen dann über denjenigen der Panzerkulturen oder nur etwas unter diesen. Warum Agar den schädlichen Einfluß der T-Strahlung in der Kontrolle so stark abschwächt oder, anders ausgedrückt, die Panzerstrahlung in ihrer fördernden Wirkung zu ersetzen vermag, ist vorläufig noch ganz rätselhaft. Man kann höchstens vermuten, daß durch den Agarzusatz der Gasaustausch der Zellen und auch ihr übriger Stoffwechsel so gefördert wird, daß dadurch die hemmende Wirkung der T-Strahlung weitgehend ausgeglichen werden kann. Ganz aufgehoben wird sie nicht. Unter ihrem Einfluß zeigen auch in den agarhaltigen Kulturen die Stickstoffgewinne der Kontrollen fallende und diejenigen der gepanzerten Kulturen steigende Tendenz, genau so wie in den zur gleichen Zeit (11. bis 13. 6.) angesetzten agarfreien Kulturen. Das geht auch aus weiter unten (S. 471–472) erwähnten Versuchen klar hervor.

Synärese.

An den Agarkulturen der Bakterien im großen Panzer wurde am 3. und 4. 4. 1942 eine merkwürdige Feststellung getroffen, die im Verlauf ihrer weiteren Verfolgung zu neuen Aufschlüssen führte. Es handelte sich damals um Kulturen von *Spirillum volutans* und *Vibrio Dunbar* auf in Reagenzröhrchen schräg erstarrtem Bouillonagar. Die Lage Berlins zu den Luftdruckkörpern änderte sich an jenen Tagen von TR am 1. über RT am 2. und R am 3. nach HR am 4. Entsprechend bewegte sich das *Spirillum* der Panzerkultur sehr viel träger und war auffallend länger im Vergleich zur Kontrollkultur. Dasselbe traf für den *Vibrio* zu, dessen Ausstrich außerdem im Panzer schwächer leuchtete als in der Kontrolle. Das alles ist nach obigen Ausführungen über

die bei ansteigendem Barometer überwiegende harte H-Strahlung ohne weiteres verständlich. Was aber überraschte, war die ungewöhnlich starke Ansammlung von Flüssigkeit in den Panzerkulturen, die in diesem Ausmaß noch niemals beobachtet wurde.

Die Angelegenheit wurde deshalb weiter verfolgt und führte schließlich zur täglichen Bestimmung der von 1 %igem Wasseragar in 24 Stunden ausgepreßten Flüssigkeitsmenge. Das Agar wurde zu je 5 ccm in ausgesucht gleichen Röhrchen sterilisiert, die dann zur Vermeidung von Verdunstungen mit Ceresin verschlossen wurden. Vor Gebrauch wurde das Agar vorsichtig verflüssigt und dann in stets gleicher Lage schräg zum Erstarren gebracht. Die Röhrchen standen am Versuchsort aufrecht oder schräg. Nach 24 Stunden wurde die abgeschiedene Flüssigkeit quantitativ in ein graduiertes Spitzgläschen überführt und gemessen. In Abb. 4 und 5 sind die gefundenen Werte als Maß für diese Kolloidänderung, die sogenannte Synärese, graphisch dargestellt und mit dem Wetterverlauf verglichen.

Synärese bedeutet eine Alterung des Kolloids, die sich im Freiwerden kolloidal gebundenen Wassers und in Aggregation der Teilchen ausdrückt, deren Oberfläche dadurch verringert wird. Biologisch gesehen ist also verstärkte Synärese einer verstärkten Hemmung gewisser an den Oberflächen sich abspielender Reaktionen gleichzusetzen, worauf sowohl die eben erwähnten Beobachtungen an den Panzerkulturen als auch die folgenden Versuche hinweisen. Die ursächliche Strahlung wird demzufolge in der T-Strahlung zu suchen sein.

In Abb. 4 verläuft die Kontrollkurve in ziemlich guter Übereinstimmung mit der Wetterkurve, während die Panzerkurve wieder die typischen Stöße, also einen unruhigeren Verlauf zeigt. Immerhin liegen ihre Gipfel zunächst wieder vor den steileren Anstiegen der Wetterkurve, deuten also auf verstärkte H-Strahlung, die so energiereich ist, daß ihre Schauer im Panzer eine beträchtlich stärkere Synärese auslösten als die Strahlung in der Kontrolle. Daß auch die Gipfel der Kontrollkurve zeitlich etwa mit den Hochdruckgebieten und die Täler etwa mit den Tiefs zusammenfallen, schien zunächst verblüffend. Man wird aber daraus folgern müssen, daß das die Synärese auslösende oder beschleunigende Agens vermutlich ein Teil der T-Strahlung ist, der sich unter den gegebenen Bedingungen schon in den Hochdruckgebieten bemerkbar machte. Denn es muß immer wieder betont werden, daß die Berliner Kontrollversuche hinter kupfernen Thermostatenwänden ausgeführt wurden, was weiter unten noch ausführlicher erörtert werden soll.

Im einzelnen fällt der erste Synärese-Kontrollgipfel vom 2. zum 3. 6. mit dem ersten Hochdruckgipfel zeitlich zusammen. Der zweite scheint sogar schon einen Tag vor dem Gipfel der Wetterkurve, am 11., erreicht zu sein, während der dritte vom 21. bis 23. wieder mitten im Hoch liegt, wo auch die „Sternbildung“ sehr schwach ist. Dann folgen noch Tage mit stark beschleunigter Synärese am 26. und 29., an denen die Wetterkurve ebenfalls wieder kleine Gipfel aufweist.

Anfang des Monats verläuft die Panzerkurve etwa parallel zur Kontrollkurve, wie das genau so schon bei der „Sternbildung“ von *Pseudomonas tumefaciens* und auch bei der Stickstoffbindung durch *Azotobacter* festgestellt werden konnte. Die gleiche Übereinstimmung zwischen biologischen Reaktionen und Synärese ist dann auch im folgenden Teil des Monats zu bemerken, insofern hier Panzer- und Kontrollkurven mehr oder weniger gegensätzlich verlaufen.

Anfang Juli fällt die Synärese-Kontrollkurve von der Ende Juni erreichten Höhe allmählich bis zum 5. ab, entsprechend einer in dieser Zeit geringen „Sternbildung“ und langen Spirillenformen. Auch weiterhin entspricht der Verlauf der Synärese durchaus dem Verhalten der Bakterien im Juli. Panzer- und Kontrollkurven sind wieder mehr parallel gelagert, und anscheinend ist im Panzer die Wirkung der Schauerstrahlung wieder viel größer als diejenige der T-Strahlung in den Kontrollen. Die im Juni so auffällige Parallelität zur Wetterkurve ist hier nicht mehr vorhanden. Die Tage mit stärkster Synärese sind meistens diejenigen, die in den Tiefsenken oder auf den abfallenden Kurvenstücken liegen, und die schwächste Synärese finden wir jeweils kurz vor oder auf den Gipfeln der Wetterkurve. Die auslösende T-Strahlung scheint hier also etwas später und deshalb vielleicht mit der jeweils schon verstärkten H-Strahlung mehr oder weniger gleichzeitig aufzutreten zu sein, möglicherweise im Zusammenhang mit einer schnelleren Aufeinanderfolge von Hoch und Tief.

1943 in Kirowograd (Ukraine) durchgeführte Messungen der Synärese brachten in verschiedener Hinsicht ein etwas anderes Ergebnis (Abb. 7—9). Erstens liegen die Werte durchschnittlich um 0,1 cm höher als 1942 in Berlin, obwohl in Kirowograd nur 4 statt 5 cm Wasseragar verwendet wurden. Das kann einfach an der Verschiedenartigkeit der Agarsorten und Gelherstellungen gelegen haben. Zweitens fallen die schroffen Gipfel im Juli und weniger auch im September auf. Dabei muß allerdings berücksichtigt werden, daß nicht nur ein örtlicher, sondern auch ein zeitlicher Unterschied zu den Berliner Versuchen besteht. Leider wurden 1943 nicht gleichzeitig auch in Berlin dieselben Synärese-Versuche durchgeführt. Ferner ist zu bedenken, daß bei im übrigen genau gleichem Ansatz und gleicher Auswertung der Versuche in Berlin 1942 und Kirowograd 1943 die Örtlichkeiten, an denen die Agarröhrchen aufgestellt wurden, doch wesentlich verschieden waren. In Berlin standen die Kontrollen in einem mit Kupferblech und Wasser umgebenen Thermostaten im Erdgeschoß der zweistöckigen, aus starken Mauern und Decken gebauten Biologischen Reichsanstalt. Wie weit eine solche Panzerung bereits weichste Anteile der T-Strahlung abzusichern vermag, geht aus den Kirowograder Versuchen hervor. Hier stand das Kontrollröhrchen im Freien zwischen vereinzelt buschartigen jungen Bäumen auf dem Erdboden, ein zweites Röhrchen im Erdgeschoß des einstöckigen, sehr leicht gebauten Hauses und ein drittes daselbst schräg liegend unter einer 19 mm dicken quadratischen Bleiplatte von 64 mm Kantenlänge. Ab 13. 9. kam dieses dritte Röhrchen in Fortfall, das zweite in einen unter einem Holzschuppen in die Erde gemauerten Keller und das erste (Kontrolle) wieder an eine ähnliche Stelle im Freien. An allen diesen Stellen war die Temperatur nicht konstant und lag oft, vor allem nachts,

weit unter 29° C. Diesem Umstand mag manche Unregelmäßigkeit entsprungen sein. Jedoch ist andererseits auch sicher, daß die extrem hohen Werte nicht auf eine entsprechende Erwärmung zurückzuführen sind.

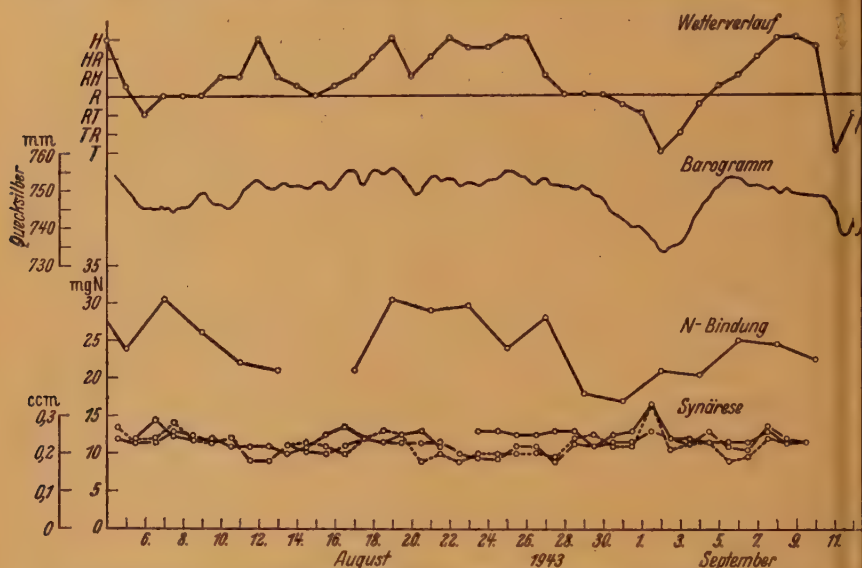


Abb. 7. N-Bindung von *Azotobacter chroococcum* und Agar-Synärese im Freien (—), im Hause (---) und hier unter 19 mm Blei (---), verglichen mit dem Wetterverlauf.

Durchschnittlich sind die im Freien ausgepreßten Wassermengen deutlich größer als diejenigen der in Gebäuden aufgestellten Röhrchen. Zweimal sinken diese sogar bis auf annähernd 0,1 cm. Wahrscheinlich vermögen demnach Häusermauern schon beträchtliche Teile der weichen T-Strahlung abzuschirmen. Erst hinter dickeren Panzern wird diese Strahlung wieder dichter.

In die Abb. 7 und 8 für die Kirowograder Synärese-Versuche ist außer der Wetterkurve auch das Barogramm eingetragen. Beide zusammen machen den Verlauf der Synärese-Kontrollkurve leichter verständlich. Ihre Gipfel liegen entweder auf und hinter den Höhen der Wetterkurve oder des Barogramms oder vor und in ihren Senken. Inu allgemeinen läßt sich aus den vorliegenden noch kurzen Versuchsabschnitten mit Vorbehalt schließen, daß die verstärkte Synärese umso früher vor einem Tief verzeichnet wurde, je ausgeprägter und ausgedehnter dieses war. Ähnliches wurde schon früher bei biologischen Reaktionen festgestellt.

Im Juli (Abb. 9) liegt der erste schwächere Synärese-Ausschlag mitten in der flachen und kleinen Tiefsenke vom 2. zum 3. Die übrigen drei stärkeren Ausschläge aber treten kurz hinter den barometrischen Gipfeln vor größeren Drucksinken auf. Die vom 21. zum 22. im Freien

vermutete sehr starke ursächliche T-Strahlung wurde hier offenbar von den Hauswänden bis zu einem Durchschnittswert abgeschirmt.

Im August (Abb. 7) sind keine größeren Wetterstürze und dem entsprechend auch keine hervorstechenden Synäresegipfel zu verzeichnen. Nur einmal, vom 6. zum 7., erreicht die abgegebene Flüssigkeitsmenge 0,3 ccm. Dieser Gipfel liegt mitten in der tiefsten Wettersenke des Monats.

Im September (Abb. 7 und 8) ist das wieder anders. Die Synäresekurve ist hier leider einmal unterbrochen. Sie bildet eine Reihe von Gipfeln, die 0,3 ccm und mehr erreichen. Ihr erster liegt kurz vor der Mitte des Tiefs. Die nächsten drei künden die kommenden Depressionen bereits an, wenn der Luftdruck einen Höchstwert erreicht hat, und am Ende des Monats wird eine flache, aber ausgedehnte Senke der Wetterkurve von zwei Synäresegipfeln ausgefüllt, zwischen die vom 28. zum 29. ein Minimum eingeschaltet ist, das zum Hoch am 2. 10. gehören

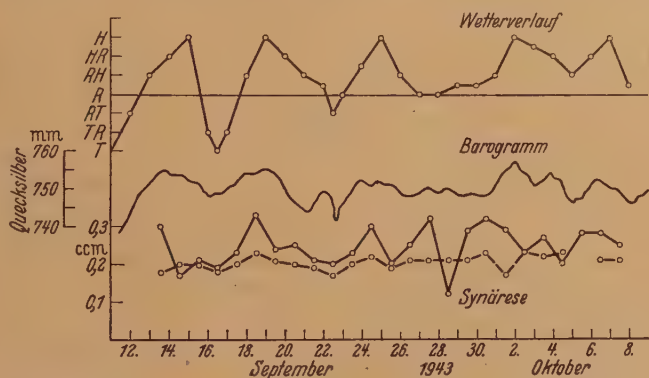


Abb. 8. Agar-Synärese im Freien (—) und im Keller (---), verglichen mit dem Wetterverlauf.

dürfte. Das am Fuße desselben liegende Synärese-Maximum könnte angesichts der hier bereits steigenden Wetterkurve überraschen. Dem ist aber entgegenzuhalten, daß sich der am 1. noch klare Himmel am Morgen des 2. vollständig mit Wolken bedeckte und dann gegen Mittag wieder aufklärte. Eine vorübergehende Einwirkung verstärkter T-Strahlung war also auch hier am örtlichen Wetterverlauf zu erkennen. Die beiden noch folgenden kleinen Maxima der Synärese Anfang Oktober entsprechen den beiden Tälern des Barogramms am 5. und 8.

B. und T. DÜLL [10, 11, 12] haben auf Grund statistischer Vergleiche mit den Sonneneruptionen zuerst darauf hingewiesen, daß zur Wetterdynamik in Beziehung stehende Reaktionen der belebten Natur wahrscheinlich auf Strahlung zurückzuführen sind. Ihrer Ansicht nach sollten die auf der Erde auftretenden Folgestralen die kolloidale Struktur der lebenden Zelle in nachteiliger Weise verändern, wie ja auffallende Beschleunigungen in der Alterung von Kolloid-Solen und -Gelen wiederholt beobachtet werden

konnten, z. B. an der Milch. Bekanntlich gerinnt diese bei Gewittern oft in ungewöhnlich kurzer Zeit. STEBNITZ und SOMMER [39] haben ferner jahreszeitliche Schwankungen in der Neigung gezuckerter Kondensmilch zur Gerinnung feststellen können. Eine der für Frischmilch in Frage kommenden Ursachen wurde früher [4] in einer vor einem Hoch erkennbaren Belebung des Milchsäurebakteriums erkannt. Die andere, wahrscheinlich noch wichtigere Ursache liegt offenbar in einer starken T-Strahlung im Gewittertief. Denn die Anschauung DÜLLS findet in den soeben mitgeteilten Versuchsergebnissen über die Synärese des organischen Kolloids Agar ihre experimentelle Bestätigung, die unabhängig von diesen Versuchen und auf anderem Wege auch von FINDEISEN [16] erbracht werden konnte. FINDEISEN hat die Zunahme der Leitfähigkeit, die gleichbedeutend ist mit einer Zunahme der Synärese, in Arsentrisulfidsolen mit dem Wetterverlauf verglichen. Sie fand im allgemeinen eine Verzögerung der Alterung bei Schauerwetter und aufklarendem Himmel und eine Beschleunigung bei Föhn und Bewölkungszunahme. Ähnlich wie bei den hier mitgeteilten Agarversuchen synäresiertes das Kolloid im Keller langsamer als im Erdgeschoß. Daraus und aus ihrer Feststellung, daß die Alterungskurve etwa spiegelbildlich zur Luftdruckkurve verläuft, auch zum täglichen Luftdruckgang, schließt FINDEISEN, daß es sich bei den Schwankungen um reine Massenwirkungen der Atmosphäre handelt, die bei höherem Druck, also dichter Masse, mehr der angenommenen wirksamen Strahlung absorbiere. Das trifft sicher ebenso zu, wie auch die Höhenstrahlung einem deutlichen Barometereffekt unterliegt, kann aber nicht die einzige Ursache der Wetterparallelität sein. Denn auch FINDEISEN hat in einem Gebäude experimentiert, in welchem die Strahlung anders beschaffen ist als in der freien Atmosphäre. Wie sollen zudem die im Kirowograd noch im Hochdruckgebiet zu Anfang des Barometerfalls festgestellten Gipfel der Synärese und ihre Minima bei gleichen, aber steigendem Barometerwerten mit Massenwirkung der Atmosphäre gedeutet werden? Höchstens so, daß beim Durchgang energiereicher Teilchen durch eine dichtere Atmosphäre mehr Schauer von weicher T-Strahlung entstehen können. Auch eine solche Massenwirkung ist zu berücksichtigen, scheint jedoch bei der Synärese-T-Strahlung wie bei der T-Strahlung überhaupt eine untergeordnete Rolle zu spielen. Denn wie könnten sonst ihre Gipfel zuweilen auch mitten im Tief liegen?!

FINDEISEN sieht mit DÜLL die biologische Wirkung der angenommenen Strahlung in einer Alterungsbeschleunigung der kolloidalen Substanzen in der lebenden Zelle. Daran dürfte nicht zu zweifeln sein, zumal hier die gleiche Wirkung, die FINDEISEN an einem anorganischen Kolloid feststellen konnte, an organischen Kolloiden nachgewiesen wurde (vgl. Abb. 16). Die Kolloidalterung kann aber wiederum nicht die alleinige Ursache aller durch die Wetterstrahlung hervorgerufenen Zellschädigungen sein, weil die Synärese nicht immer genau dann zunahm, wenn lebenswichtige Reaktionen der untersuchten Bakterien eine Hemmung zeigten und umgekehrt. Es braucht da nur an die intensivere Stickstoffbindung durch *Azotobacter* im Panzer bei gleichzeitig stärkerer Synärese erinnert zu werden, die andererseits daselbst auch besonders stark war, als nur verhältnismäßig wenig Stickstoff gebunden wurde (18.—22. 6. 1942). Damit soll die biologische Bedeutung der von der T-Strahlung hervorgerufenen Beschleunigung der Kolloidalterung in keiner Weise geschmälert werden. Man muß sogar annehmen, daß das Altern der Zellen und Organismen, gewisse Krankheiten

und der Alterstod zu einem guten Teil darauf beruhen⁴. Überdies braucht sich die fällende Wirkung der T-Strahlung nicht auf Kolloide allein zu beschränken. Denn die Synärese kolloidal gelöster Stoffe ist diesbezüglich vergleichbar z. B. mit der Kristallisation oder Fällung echt gelöster Stoffe.

Vergleich zwischen verschiedenen Klimagebieten.

Die schon früher verschiedentlich berührte Frage, ob sich die Organismen nicht nur am gleichen Ort zeitlich mit dem wechselnden Wetter in Entwicklung und Stoffwechsel ändern, sondern auch zur gleichen Zeit in verschiedenen Klimagebieten, konnte im kontinentalen Klima der Ukraine mit den dort seltenen extremen Hochdruckwetterlagen einerseits und im weniger ariden Klima Berlins andererseits am Beispiel der Stickstoffbindung durch *Azotobacter* experimentell verfolgt werden.

Im Juli 1943 wurde gleichzeitig in Berlin⁵ und in Kirowograd⁶ laufend *Azotobacter chroococcum*, Stamm R_1 , zwar in verschiedenen Brutschränken⁷ und Gebäuden, aber unter sonst völlig gleichen Bedingungen auf synthetischem Agar-Nährboden in Röhrchen vorgezchtet und dann während 2 Tagen in 100 ccm fassenden Erlenmeyerkolben aus Jenaer Glas Nr. 20 in 10 ccm folgender, auch für das Agar verwendeter Nährlösung kultiviert: H_2O 100, Glykose 2, $CaCO_3$ 0,1, Agar 0,1, K_2HPO_4 0,1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,05, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,01, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0,01. Aus technischen Gründen war die Verwendung größerer Mengen Nährlösung nicht möglich.

Aus den Stickstoffwerten (Abb. 9), die für die Kirowograder Kulturen nach Versand⁸ derselben in zugeschmolzenen Ampullen vom Berliner Laboratorium ermittelt wurden mit derselben Methode wie für die Berliner Versuche, ist klar zu ersehen, daß während der Versuchszeit, während welcher in Kirowograd das Wetter nicht einmal besonders durch Hochdrucklagen ausgezeichnet war, im dortigen Lebensraum der Bakterien durchschnittlich mehr Stickstoff gebunden wurde als in Berlin. Hier mußte also eine für die Stickstoffbindung und Entwicklung des Bakteriums weniger günstige Strahlung vorherrschen als in Kirowograd. Oder das Kirowograder Strahlenklima entsprach, was die Stickstoffbindung betrifft, mehr den Strahlungsverhältnissen im schweren Panzer, jedenfalls während der Versuchszeit mit Ausnahme der vier letzten Julitage. Während dieser vier Tage ist offensichtlich

⁴ Herr Professor Dr. KOLHÖRSTER vertrat diese Ansicht bezüglich der Höhenstrahlung in einer persönlichen Mitteilung.

⁵ Für die Leitung der Berliner Arbeiten bin ich Herrn Oberregierungsrat Dr. STAPP sehr zu Dank verbunden.

⁶ Für die Ermöglichung dieser und der noch folgenden Untersuchungen bin ich Herrn Dr. NOSTER zu Dank verpflichtet.

⁷ Der von mir verwendete Brutschrank wurde von meinem damaligen Kameraden OTREBSKI in mühevoller Arbeit aus Holz gefertigt und ist S. 473 näher beschrieben. Ihm spreche ich auch an dieser Stelle meinen verbindlichsten Dank aus.

⁸ Dadurch können höchstens geringe Verluste eingetreten sein.

eine Strahlung wirksam gewesen, die sich zwischen einem östlich gelegenen Tiefdruckgebiet und einem westlich gelegenen, später bis Kirowograd vordringenden Hoch für Stickstoffbindung und Entwicklung von *Azotobacter* schädlicher erwiesen hat als beispielsweise die Strahlung vor dem ausgeprägten Tief am 11. 7.

Wenn man von der durchschnittlich tieferen Lage absieht, verläuft die Berliner Stickstoffkurve in ähnlicher Weise wie die Kirowograder

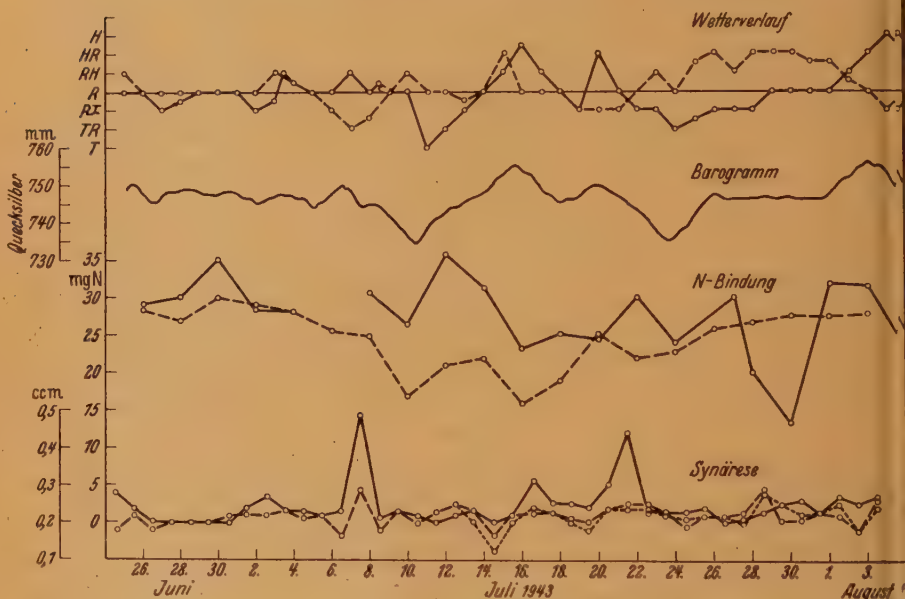


Abb. 9. Gleichzeitige N-Bindung von *Azotobacter chroococcum* in Berlin (—) und Kirowograd (---) sowie Agar-Synärese in Kirowograd im Freien (—), im Hause (---) und hier unter 19 mm Blei (- · -) verglichen mit dem Wetterverlauf in Berlin (—) und Kirowograd (—).

und ebenfalls in ausreichender Übereinstimmung nicht nur mit der Berliner, sondern auch mit der Kirowograder Wetterkurve. Um so merkwürdiger sind die in Kirowograd erzielten höheren Stickstoffgewinne. Die Ursache hierfür ist vielleicht in irgendeiner Einflußnahme großer Ländermassen auf die Strahlung zu suchen. Von der Höhenstrahlung ist bekannt, daß ihre Intensität an der Erdoberfläche nicht nur nord-südliche, sondern auch ost-westliche Differenzen aufweist. Daß sich gerade hier in Südrußland die ausgedehnten Schwarzerdegebiete befinden, ist sicher nicht nur auf die fehlende Auswaschung des Bodens und andere bekannte Klimafaktoren zurückzuführen, sondern auch auf die stärkere Stickstoffbindung.

Etwas weiter westlich, in Jaslo am Nordrand der Beskiden, gelang es auch, *Aspergillus niger* auf stickstofffreier, molybdänhaltiger Nährlösung in vier Tagen zu einer zusammenhängenden, allerdings dünnen Mycelhaut mit zahlreichen Konidien anwachsen zu sehen, was früher in Berlin und später

in Fredericia (Dänemark) unter sonst gleichen Versuchsbedingungen nie gelungen ist. Gelegentlich wurde schon darauf hingewiesen, daß eine Stickstoffbindung durch *Aspergillus niger*, die SCHOBER [34] einmal nachgewiesen haben will, sehr wohl möglich ist, sofern nur die Art der Luftdruckverteilung (Wetterstrahlung) es zuläßt. In Mitteleuropa dürfte das nur selten der Fall sein, im Osten dagegen schon eher.

Da die Vergleichsversuche mit *Azotobacter* in verschiedenen Brut-schränken ausgeführt wurden, nämlich in einem metallenen (Berlin) und in einem hölzernen (Kirowograd), besteht auch immer noch die Möglichkeit, daß die ermittelten Unterschiede in der Stickstoffbindung hierauf zurückzuführen sind. Entsprechende kurzfristige Versuche in Jaslo und Fredericia haben allerdings vorläufig keine Beweise für eine wesentliche Beeinflussung der Stickstoffbindung durch das Thermostatenmetall erbracht. Jedoch machte sich immer stärker der Verdacht geltend, daß die in den üblichen metallenen Brutschränken, vor allem mit einigen anderen Versuchsobjekten gewonnenen Ergebnisse nicht die Strahlungsverhältnisse in der freien Atmosphäre wiedergeben. Deshalb mußte diese Frage in ausge-dehnteren Vergleichsversuchen einer näheren Prüfung unterzogen werden.

Vergleiche zwischen Holz- und Metallbrutschrank.

Bei dem verwendeten Metallbrutschrank mit $30 \times 30 \times 40$ cm Innenraum handelt es sich um einen doppelwandig (je etwa 1 mm) kupfernen Schrank mit Wasser als Wandfüllung, der außen mit Leichtmetall und Asbest unbekannter Dicke verkleidet und an den Kanten durch vernickeltes, 3 mm dickes und 27 mm breites Messing verstärkt war. Er wurde durch zwei einschiebbare Heizpatronen von unten elektrisch beheizt und durch einen in den Wassermantel eintauchenden Thermoregulator auf konstanter Temperatur gehalten.

Die Holzbrutschränke enthielten dagegen in den Wänden kein Metall. Diese bestanden aus doppelten Sperrholzplatten mit Watte-Zwischenfüllung. An der Decke des $30 \times 30 \times 30$ cm großen Innenraumes war ein Bimetall-Thermoregulator aufgehängt, der die Heizung vermittelt der in einer hinteren Ecke aufgestellten, gegen den übrigen Raum abgeschirmten Glühbirne regulierte, so daß sich die Temperatur während der angeführten Zeiten und in Nähe der Versuchsobjekte zwischen 28 und 30° C hielt. Zeitweilig, außerhalb der hier erwähnten Versuchszeiten, kam es in dem einen der beiden Holzbrutschränke zu größeren Temperaturschwankungen. Infolge Lichtbogenbildung verschmolzen die beiden Pole des Regulators. Das geschah fast ausschließlich beim Übergang von Tief- zu Hochdruckwetter, vielleicht infolge stärkerer Ionisierung der Luft. Diese etwa inmitten der hölzernen Thermostaten hängenden Thermoregulatoren enthielten das einzige Metall, das mitunter noch störend gewirkt haben könnte. Sie bestanden, abgesehen von dem etwa 15 mm breiten, senkrecht hängenden Bimetallstreifen im wesentlichen aus der 65 mm im Durchmesser großen Kapsel aus dünnem Eisenblech.

Synärese.

Der erste Vergleich zwischen Metall- und Holzbrutschrank kam in Jaslo zur Ausführung, und zwar durch Bestimmung der Synärese in der Art, wie sie weiter oben beschrieben wurde. Der Metallthermostat

stand im Erdgeschoß und der hölzerne im obersten der drei Stockwerke desselben massiv gebauten Hauses.

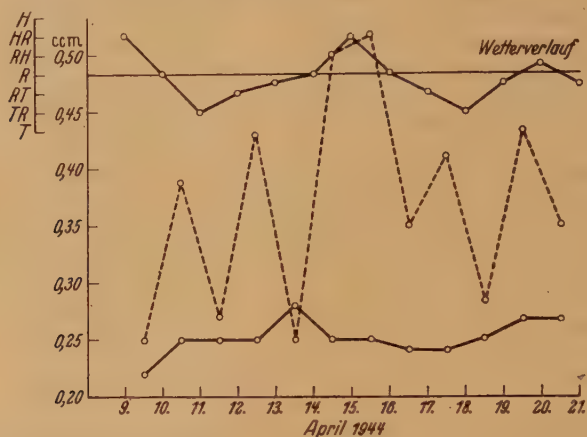


Abb. 10. Synärese im Holz- (---) und Metall- (—) Brutschrank.

In Abb. 10 tritt der Unterschied zwischen den Ergebnissen in beiden Brutschränken klar zu Tage. Während die Synärese im Metallbrutschrank M während der ganzen Zeit annähernd gleich und verhältnis-

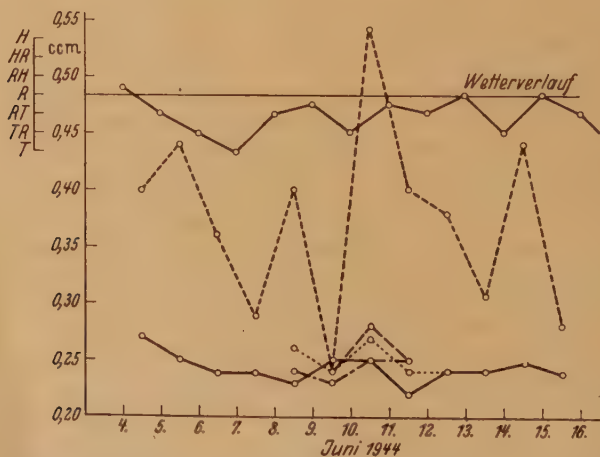


Abb. 11. Synärese im Holzbrutschrank (---), darin unter 0.1 mm Eisen (—) und unter 0.6 mm Nickel + 0.7 mm Kupfer (—, —, —) sowie im Metallbrutschrank (—) und darin unter 0.6 mm Nickel + 0.7 mm Kupfer (.....).

mäßig gering blieb, war sie im Holzbrutschrank H viel stärker und so schwankend, daß sich darin gewissermaßen die einzelnen starken Schauer der Strahlung widerzuspiegeln scheinen. Hieraus läßt sich

schließen⁹, daß durch die Hausmauern und noch viel mehr durch die metallenen Wände des Brutschranks wesentliche Teile der T-Strahlung zurückgehalten werden, und daß somit die weichsten Anteile der Wetterstrahlung bisher mit den Kontrollen im Metallbrutschrank überhaupt nicht erfaßt wurden.

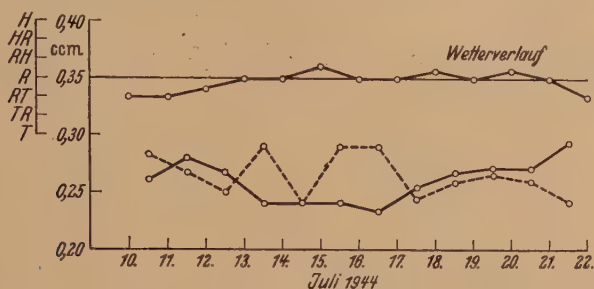


Abb. 12. Synärese im Holz- (----) und Metall- (—) Brutschrank.

Diese Versuche wurden dann etwas später in Fredericia fortgesetzt, wo auch die noch folgenden Experimente zur Durchführung kamen. Hier stand der Holzbrutschrank etwa zwei Meter von dem metallenen entfernt im ersten Stock eines dreistöckigen, ebenfalls massiv aufgeführten Gebäudes. Auch hier war das Ergebnis zunächst ähnlich demjenigen der Jasloer Versuche (Abb. 11). Aber nicht immer ergaben sich so große Unterschiede. Im Juli und August z. B. verliefen die Kurven von M und H etwa auf gleicher Höhe (Abb. 12 und 13), und im September ragten nur einzelne Spitzen von H über M hinaus (Abb. 14),

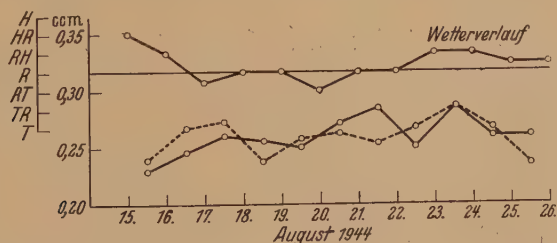


Abb. 13. Synärese im Holz- (----) und Metall- (—) Brutschrank.

ganz ähnlich den Kurven für den Kirowograder Synäresevergleich zwischen Freiluft und Gebäude. Welche charakteristischen Wetterlagen für das Emporschnellen der H-Kurven bezeichnend sind, ist bei häufiger Wiederholung solcher Versuche leicht zu merken. Immer sind es Depressionen oder Verstärkungen bereits vorhandener Depressionslagen, die sich in den Synäresegipfeln ankündigen. Gipfel und Täler

⁹ Immer, auch bei allen noch folgenden Versuchsdeutungen, nur auf Grund der gegebenen Arbeitshypothese, so lange noch keine physikalische Analyse der Wetterstrahlung vorliegt.

liegen übrigens in den H- und M-Kurven nicht nur verschieden hoch, sondern sind auch zeitlich gegeneinander verschoben (Abb. 14), und zwar scheinen sie in H etwas früher erreicht zu sein als in M. Das würde heißen, daß zunächst im Agar des Holzbrutschranks hinter den Hausmauern als Folge einer verhältnismäßig weichen primären Strahlung

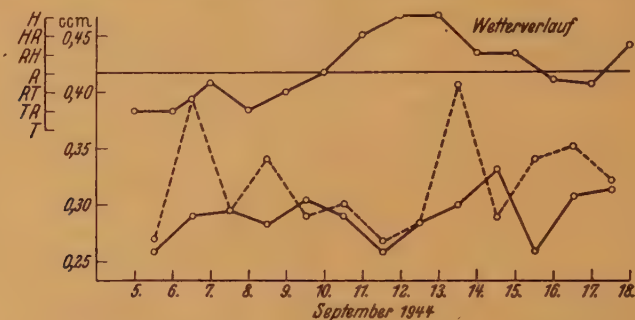


Abb. 14. Synärese im Holz- (---) und Metall (—) Brutschrank.

lung die synäretisch wirksame ihr Maximum erreicht und dann etwas später auch im metallenen Brutschrank, ausgelöst durch eine etwas härtere primäre Strahlung. Demnach wäre hier die Wetterstrahlung, summarisch betrachtet, gegen das Tief zu allmählich härter geworden.

Wenn es Strahlung ist, welche die Synärese so stark beeinflusst, dann müssen sich ähnliche Unterschiede wie in obigen Versuchen auch dann ergeben, wenn ein Teil der Agarröhrchen im Holzbrutschrank (H) mit Metall umhüllt wird. Das geschah z. B. in der Versuchsreihe der Abb. 11, einmal mit einer nur 0,1 mm starken Blechhülse (H(M)) und zum andern mit einer 0,6 mm starken Nickelhülse, die noch mit einem 0,7 mm starken Kupferdeckel abgedeckt wurde (HM). Die ebenso geschützten Röhrchen im Metallbrutschrank seien mit MM und die dort befindlichen Kontrollen mit M bezeichnet. Die Versuchszeit ist nur kurz. Aber so viel ist doch zu sehen, daß schon 0,1 mm Eisen den Synäresewert auf ein Minimum herabdrückt. Vielleicht ist dieses noch vollkommener in HM und M erreicht und in MM bereits überschritten, so daß hier die Bildung wirksamer Folgestrahlung schon etwas zu überwiegen scheint.

Eine derartig weiche Strahlung muß natürlich schon von Hausmauern absorbiert werden. Es war deshalb zu untersuchen, ob sich die Differenzen zwischen den Ergebnissen im Metall- und im Holzbrutschrank noch weiter vergrößern ließen, wenn dieser möglichst frei stand. Zu diesem Zweck wurde ein zweiter Holzbrutschrank, der genau so gebaut war wie der erste, auf dem Dachboden unmittelbar unter den Dachziegeln aufgestellt.

Auch diese Zeit der in Abb. 15 dargestellten Versuche ist zu kurz bemessen, um Endgültiges aussagen zu können. Immerhin läßt sich vielleicht herauslesen, daß die Werte für den neuen Holzbrutschrank nH durchschnittlich noch höher liegen als diejenigen für H, und daß

die Gipfel und Täler für nH teilweise gegen diejenigen von H und M seitlich verschoben sind. Offenbar liegen auch hier wieder Gipfel und Täler von nH und H stellenweise vor denjenigen von M. Wieder

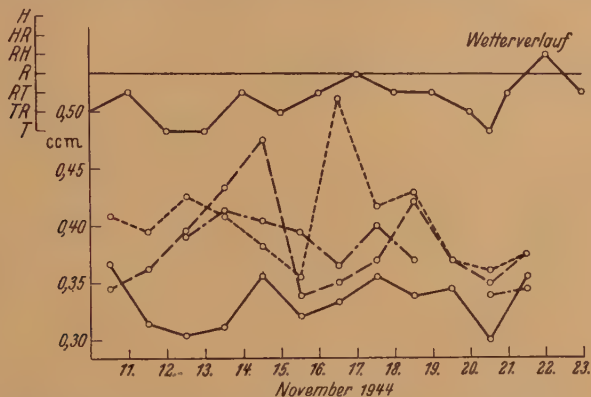


Abb. 15. Synärese im Holzbrutschrank unter dem Hausdach (---), darin unter 0,1 mm Eisen (— · — · —), im Holzbrutschrank im 1. Stock desselben Hauses (—) und dort im Metallbrutschrank (— · — · —).

wäre das ein Zeichen dafür, daß die Wetterstrahlung vom Hoch zum Tief allmählich härter wird.

Die Kurve nHM (0,1 mm Eisen) verläuft ungefähr spiegelbildlich zur Kurve nH. Das bedeutet, daß dann, wenn die atmosphärische Strahlung am weichsten ist, in nHM am wenigsten davon zur Wirkung kommt und umgekehrt. Die Kurve nHM liegt auch deutlich höher als die M-Kurve. Sie hält sich im Durchschnitt fast auf der Höhe von H, ganz im Gegensatz zur Kurve HM der oben erwähnten Versuche. In der Primärstrahlung werden also mehr verhältnismäßig weiche Anteile enthalten gewesen sein, die im weniger geschützten Agar hinter den Hausmauern (H) und hinter dem dünnen Eisenblech (nHM) synäretisch wirksame Strahlung hervorriefen, als härtere, die diese weiche Folgestrahlung erst im stärker gepanzerten Metallbrutschrank erzeugten. Daß einfach die synäretisch wirksame Strahlung selbst von den Hausmauern und dem Eisenblech mehr durchgelassen wurde als von den kupfernen Thermostatenwänden, ist wegen der gleich noch nachzuweisenden sehr geringen Durchdringungsfähigkeit dieser Strahlung nicht anzunehmen.

Die Synärese-T-Strahlung war jedenfalls im Holzbrutschrank unter dem Hausdach intensiver als hinter dünnen Metallschichten oder anderen entsprechend dichten Materialien. Das gilt nicht nur für Agar, sondern ebenso z. B. für LÖFFLERSchen Serumnährboden, in gleicher Weise wie jener untersucht (Abb. 16).

Welche Dichte ohne Einbuße durchdrungen wird, bleibt noch festzustellen. Nach neuesten vorläufigen Versuchsergebnissen werden diese Strahlen schon durch Stanniolpapier abgeschirmt, ja sogar durch Glas ge-

wöhnlicher Dicke (Tab. I), das aber auch umgekehrt, anscheinend bei entsprechend härterer Strahlung durch Vermehrung wirksamer Folgestrahlen die Synärese noch etwas erhöhen kann (2.—3.5.). In den gläsernen agar-

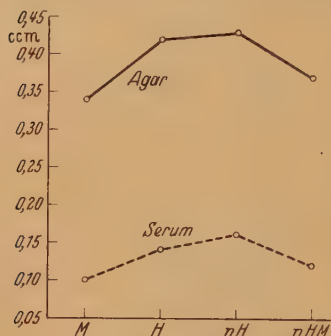


Abb. 16. Vergleich zwischen der Synärese von Agar und Serum unter verschiedenen Bedingungen vom 18. bis 19. 11. 1944 vor einer Depression.

Atmosphäre vorkommt, ist demnach noch eine offenstehende Frage.

Tabelle I.

Einfluß verschiedener Materialien auf die synäretisch wirksame Strahlung.

Bezeichnung des Materials	1/100 ccm Flüssigkeit					
	April 1945				Mai	
	12.-13.	7.-8.	27.-28.	29.-30.	2.-3.	3.-4.
M	35	31				
nH	48	39	39	50	51	42
nHM			34	39	42	42
A	37	34				
S	35	33				
G			34	36	53	49
P						59
Qu						19
Qu + G						09

M = Agar im Glasröhrchen im kupfernen Brutschrank im 1. Stock,
 nH = " " " " Holzbrutschrank unter dem Hausdach,
 nHM = " " " " daselbst unter 1 mm Messing + 1 mm Kupfer,
 A = " " " " 1,5 mm Aluminium,
 S = " " " " einer Schicht Stanniolpapier,
 G = " " " " 1 mm Glas,
 P = " " " " 4 Schichten weißen Schreibpapiers,

Qu = 8 statt 4 ccm Agar im Quarztiegel schräg erstarrt, mit Öffnung nach unten auf flacher Glasschale, mit Paraffin abgedichtet,
 Qu + G = dasselbe mit 1 mm starkem Becherglas überdeckt.

Kohlensäurebildung durch Hefe.

Nach diesen Ergebnissen mit den drei verschiedenen Brutschränken war es natürlich wichtig, hierin auch die Lebensäußerungen einiger Mikroorganismen miteinander zu vergleichen; und zwar kam es darauf an, nicht nur die summarische Gesamtentwicklung eines Mikroben als Test zu bewerten, sondern vor allem auch einzelne biochemische Reaktionen oder Reaktionsketten. Als solche kam z. B. die Kohlensäurebildung durch *Hefe* in Betracht.

Bäckerhefe wurde rein gezüchtet und dann bis zur starken Trübung in natursauere 5 %ige Traubenzuckerbouillon mit 0,001 % $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ und 0,001 % $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ überimpft. Diese Aufschwemmung wurde zu je 10 ccm in Reagenzgläser abgefüllt, die dann mit Gummistopfen verschlossen wurden, durch welche je ein dünnes Gasableitungsrohr die gebildete Kohlensäure in eine an der Spitze zugeschmolzene, mit etwa 3 %iger Kochsalzlösung gefüllte 10 ccm-Pipette überführte. Eine solche Apparatur mit je zwei Kulturen wurde in jeden Brutschrank eingestellt. Die Gärung kam sehr bald in Gang. Wenn die Pipetten ganz mit Kohlensäure angefüllt waren, konnten sie erneut mit Kochsalzlösung beschickt und die Versuche dann fortgesetzt werden.

Meistens lagen die Gärungskurven von H mehr oder weniger deutlich höher als diejenigen von M (Abb. 17). In diesen Fällen war kein beständiges Schönwetter zu erwarten, sondern eher die Annäherung einer Depression oder jedenfalls keine wesentliche Wetterbesserung. Sogar sehr kleine Störungen, kenntlich an vorübergehender Bewölkungszunahme, schienen sich bei einzelnen Ablesungen in größeren Kohlen-säureschüben der H-Gärung gegenüber der M-Gärung bemerkbar zu machen. Auf Grund der gegebenen Theorie sowie aller bisherigen und noch folgenden Feststellungen wird also T-Strahlung gärungsfördernd sein.

Bei horizontalerem Verlauf der Wetterkurve in Nähe der Linie R glichen sich die Gärungsintensitäten mehr und mehr an und konnten sogar ein umgekehrtes Verhältnis erreichen, das allerdings nie so groß wurde, solange das Wetter keine entschiedenere Wendung zum Hoch hin nahm. Die M-Kurve lag dann dicht über der H-Kurve. Ein Beispiel hierfür bieten die in Abb. 18 dargestellten Gärversuche, die zur Zeit einer weder deutlich zyklonalen noch deutlich antizyklonalen Wetterentwicklung stattfanden. Hier wird also vermutlich die weiche

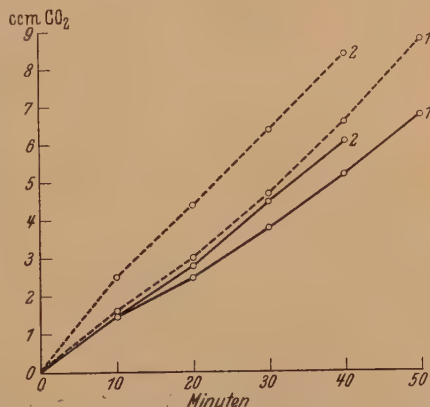


Abb. 17. Hefegärung im Holz- (---) und Metall- (—) Brutschrank am 3. 9. 1944 vor einer Depression.

gärungsfördernde Strahlung kaum intensiver gewesen sein als eine etwas härtere, die sekundär hinter den kupfernen Wänden des Thermostaten die wirksame weiche Strahlung hervorrief.

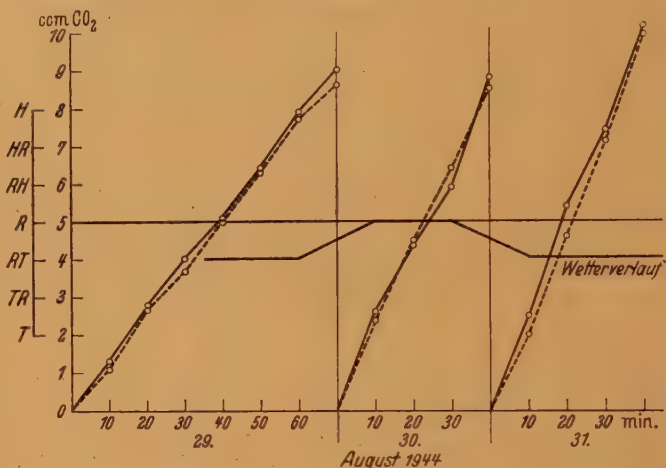


Abb. 18. Hefegärung im Holz- (---) und Metall- (—) Brutschrank.

Noch deutlicher tritt das in den folgenden etwas kürzeren Versuchsreihen zutage, in denen auch nH vertreten ist und die Gärung hier

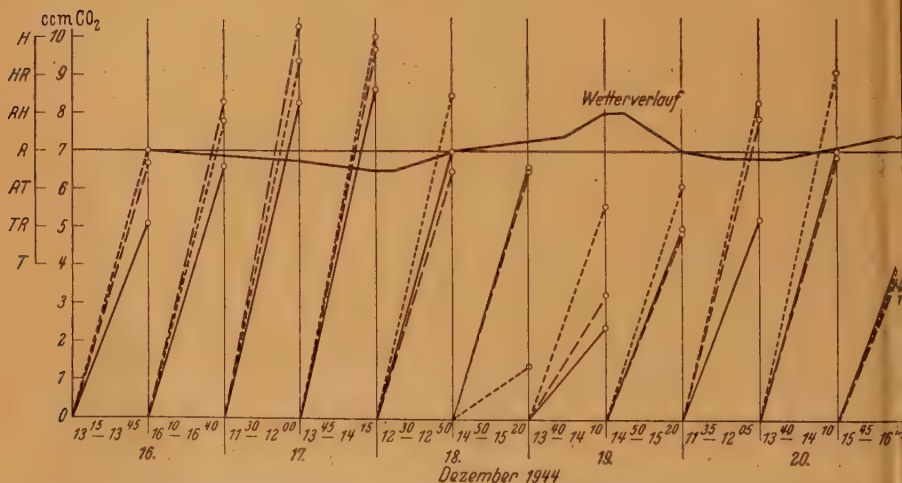


Abb. 19. Hefegärung im Holzbrutschrank unter dem Hausdach (---), im Holzbrutschrank im 1. Stock desselben Gebäudes (----) und dort im Metallbrutschrank (—).

und in H unter dem Einfluß überwiegender T-Strahlung meistens stürmischer verlief als in M (Abb. 19 und 20). Besonders deutlich war dieser Unterschied wieder, wenn sich die Wetterkurve entsprechend

deutlich senkte, wie auch das umgekehrte Verhältnis, also stärkere Gärung in M als in nH oder H, dann sehr klar hervortrat, wenn sich ein entsprechender Wetterumschwung in antizyklonaler Richtung anbahnte. Das ist bei derartig kurzfristigen Versuchen (vgl. auch die

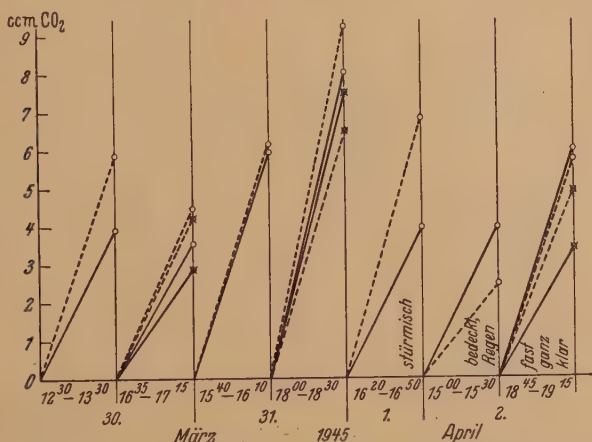


Abb. 20. Hefegärung im Holzbrutschrank unter dem Hausdach (----) und im Metallbrutschrank im 1. Stock desselben Hauses (—) mit alter (O) und frischer (*) Kultur in der Wiederholung.

früher beschriebene Abhängigkeit des Bakterienschwärmens vom Wetter [4]) nicht immer mit Sicherheit aus den Wetterkarten zu entnehmen. Dann bietet aber die Bewölkungszu- und -abnahme ein untrügliches Zeichen für die herrschende Art der Wetterstrahlung. So geht auch in der kurzen Versuchsreihe der Abb. 20, für die Wetterkarten nicht zur Verfügung standen, aus den am 1. und 2. 4. eingetragenen eigenen Wetterbeobachtungen hervor, daß am 1. ein Sturmtief heranzog, auf dessen Rückseite am 2. abends nach Regen bereits Aufklärung folgte. Dementsprechend war die Kohlensäureproduktion am 1. stärker in nH (T-Strahlung) und am 2. stärker in M (H-Strahlung).

Die ziemlich regelmäßig wiederkehrende Annäherung der Werte von M und H an nH oder sogar Umkehr des Verhältnisses bei der zweiten Ableseung eines Gärversuches dürfte vor allem mit Erschöpfung der anfangs stürmischer gärenden Kultur zu erklären sein, wenn auch nicht die Möglichkeit von der Hand zu weisen ist, daß die weiche T-Strahlung im allgemeinen gegen Abend abnimmt oder härtere Anteile vermehrt auftreten. Abends pflegt auch die Synärese schwächer zu werden, und noch manche andere Tatsache deutet auf ein abendliches Härterwerden der Wetterstrahlung. Auch dann, wenn anstelle der alten eine frisch beimpfte Nährlösung zum zweiten Versuch verwendet wird, ist mitunter bei entsprechendem Wetter eine Annäherung von M an nH feststellbar und auch eine Umkehr des ursprünglichen Verhältnisses. Bei allen derartigen Versuchen fiel auf, daß die alten Kulturen im Vergleich zu den frischen mit dem einmal empfangenen

Kulturen, von 1 mm starkem Messing überdeckt, untergebracht (nHM). Diese verhielten sich nun nicht etwa jeweils genau so wie die Kulturen in M, sondern meistens ganz anders, oft noch schwächer gärend als diese (Abb. 21). Fast immer wurde anfänglich in nHM weniger Kohlensäure gebildet als in nH, was dem zyklonalen Wetter durchaus entspricht (Abb. 21 und 22). Dennoch wird die Gesamtstrahlung während der Versuchszeit der Abb. 21 auch härtere Anteile umfaßt haben, weil hier in der Mehrzahl der Fälle die Gärung in H, zweimal sogar in M stärker war als in nH. Natürlich muß es vorläufig dahingestellt bleiben, ob die 1 mm starke Messingschicht gärungsfördernde, weiche Strahlungsanteile abgeschirmt und im Gegensatz zum Mauerwerk des Hauses (H) und den kupfernen Wänden des Brutschrankes (M) kaum wirksame Sekundärstrahlung gebildet hat, oder ob den Versuchsergebnissen andere Ursachen zu Grunde liegen. Jedenfalls haben diese Versuche gezeigt, daß auch bei der Wetterempfindlichkeit der Gärung Strahlungseinflüsse als Ursache anzunehmen sind.

Kohlensäurebildung durch *Bacterium coli commune*.

Ob die wahrscheinlich fördernde Wirkung weicher T-Strahlung auf die Gärung an *Hefe* gebunden oder von allgemeinerer Gültigkeit ist, soll im folgenden das Beispiel des *Bacterium coli commune* zeigen.

Die Versuchsanordnung war hier die gleiche wie bei der Hefe. Nur wurde als Nährlösung eine 1 %ige Traubenzucker-Bouillon verwendet, die insgesamt vor Verteilung auf die Gärröhrchen mit dem 24 Stunden alten Bewuchs eines Bouillonagar-Schrägröhrchens gleichmäßig beimpft wurde. Die Versuche dauerten hier wegen der schwächeren Gärung nicht Minuten, sondern mehrere Stunden.

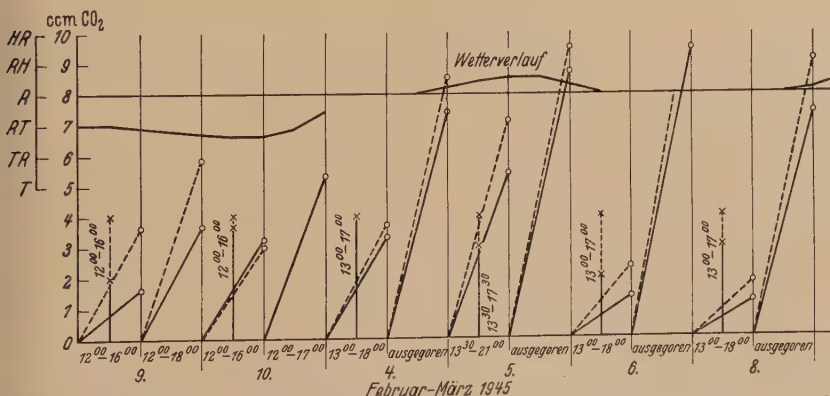


Abb. 23. Gärung (O) und Reduktionswirkung (X) von *Bact. coli commune* im Holzbrutschrank unter dem Hausdach (----) und im Metallbrutschrank im 1. Stock desselben Hauses (—).

Abb. 23 beweist ganz eindeutig, daß auch *Bact. coli* fast immer in nH stürmischer gärt als in M. Darüber hinaus zeigt diese Versuchsreihe, daß nicht nur die Anfangsgärung in nH gegenüber M beschleunigt,

sondern auch die während des gesamten Gärungsablaufs gebildete Kohlensäuremenge nach etwa 24 Stunden in nH größer ist, daß also offenbar unter dem Einfluß der weichen T-Strahlung mehr Zucker vergoren und weniger anderweitig (Atmung, Assimilation) verbraucht wird. Diese fördernde Wirkung der T-Strahlung auf die Gärung geht auch daraus hervor, daß unter beiden Bedingungen insgesamt um so mehr Kohlensäure gebildet wurde, je größer anfangs der Vorsprung von nH gegenüber M war.

Die von A. RIPPET [28] nachgewiesene Abhängigkeit der von *Hefe*-kulturen abgegebenen Kohlensäuremengen vom Barometerdruck wird, wie man nun annehmen muß, nicht allein mit den Druckschwankungen erklärt werden können, sondern außerdem mit der gärungsfördernden Wirkung verstärkter T-Strahlung bei fallendem Barometer. Diese wird vielleicht auch die Ursache sein für das gehäufte Auftreten der Tympanie (Aufblähen des Pansens bei Wiederkäuern) zur Zeit „bestimmter“ Wetterlagen¹¹.

Methylenblaureduktion

durch *Proteus vulgaris* und *Bacterium coli commune*.

Mit diesen Feststellungen über den Einfluß der Wetterstrahlung auf die Gärung tauchte die Frage auf, ob auch einfache Reduktionswirkungen von Bakterien in ähnlicher Weise reagieren.

Als Versuchsobjekte hierfür dienten *Proteus vulgaris*, Stamm X 19, und *Bacterium coli commune*. Sie wurden in einigen Tropfen einer dichten Aufschwemmung von 24 Stunden alter Schrägagar-Kultur in physiologischer Kochsalzlösung einem verflüssigten und wieder auf 40° C abgekühlten, 1 %igen Bouillonagar mit 0,5 % gesättigter alkoholischer Methylenblaulösung beigemischt. Das so beimpfte Agar wurde dann auf die gleichlumigen Versuchsröhrchen in gleicher Schichthöhe verteilt, wo es senkrecht stehend erstarrte. Je zwei dieser Röhrchen kamen dann in die verschiedenen Brutschränke, wo die Reduktion des Methylenblaus nach mehreren Stunden begann. Wie weit diese nach einer gewissen Zeit fortgeschritten war, ist in den Abb. 21—23 vermerkt.

Die absoluten Werte sind auch hier genau so wie bei den nicht zu Ende geführten Gärversuchen belanglos, weil Impfmenge und Versuchszeit nicht konstant gehalten wurden. Die relativen Werte bedeuten:

- 4 = Methylenblau in der gesamten Agarschicht (bis auf die oberste 1 mm-Zone) vollständig reduziert,
- 3 = Reduktion nur in der oberen Hälfte vollständig,
- 2 = gesamte Agarschicht noch grün und
- 1 = gesamte Agarschicht noch hellblau.

Bemerkenswert ist, daß diese Reduktion ungefähr ebenso auf die Wetterstrahlung anspricht wie die Gärung, daß sie also auch vermutlich durch T-Strahlung gefördert wird. Allerdings scheint die Reduktionskraft von *Proteus vulgaris* schon etwas früher zu reagieren als die *Hefegärung*.

¹¹ Nach brieflicher Mitteilung von Herrn Dr. PLAAS aus der Biologischen Versuchsanstalt in Bäuerlinshalde am Bodensee.

Aus allen bisher beschriebenen Versuchen hat sich somit ergeben, daß die T-Strahlung biologische und physiko-chemische Vorgänge durchaus nicht immer hemmt. Vielmehr scheinen die Synärese von Kolloiden, biologische Reduktionen und Gärungen sowie das Zellwachstum durch diese weiche Strahlung deutlich gefördert zu werden. Da aber andererseits auch gewisse Lebensäußerungen durch diese Strahlung gleichzeitig gehemmt werden wie z. B. die Schwärmtätigkeit von Bakterien, die „Sternbildung“ von *Pseudomonas tumefaciens*, die Schwärmsporenbildung von *Phytophthora infestans*, die Volutinansammlung in Hefezellen vor ihrer Kopulation und ähnliche, alles Vorgänge, die offenbar mit der sexuellen Vermehrung und darum wahrscheinlich mit der Zellatmung eng verknüpft sind, war es notwendig, auch einige reine Oxydationsreaktionen bei Mikroorganismen zu prüfen. Als solche wurden die Essigsäurebildung aus Alkohol durch Bakterien und die Nitrifikation gewählt.

Alkoholoxydation zu Essigsäure und Nitrifikation.

Eine 24 Stunden alte Reinkultur eines aus abgestandenem Bier gezüchteten Bakteriums auf Schrägagar von 5 %iger saurer Glykose-Bouillon wurde mit 20 ccm Leitungswasser + 0,05 % K_2HPO_4 + 0,02 % $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ + Spur $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ abgeschwemmt und diese so gleichmäßig beimpfte Lösung dann mit 6 % Äthylalkohol versetzt. Davon wurden je 10 ccm in die 50 ccm fassenden Versuchskölbchen abgefüllt. Nach mehreren (etwa 3) Stunden konnte dann die relative Menge der gebildeten Essigsäure, d. h. die Differenz der beiden unter verschiedenen Bedingungen entstandenen Mengen, mit einer 1:50 verdünnten gesättigten Sodalösung und Phenolphthalein als Indikator bestimmt werden. Die Bestimmung der absoluten Mengen wurde auch hier nicht für notwendig erachtet und war außerdem unter den gegebenen Verhältnissen nicht durchführbar.

Für die Nitrifikationsversuche stand eine Anreicherungskultur zur Verfügung, die durch mehrfaches Abgießen der überstehenden Flüssigkeit und Ersatz derselben durch Leitungswasser vom gebildeten Nitrat befreit worden war. Von ihr wurden nach kräftigem Schütteln 10 ccm in 100 ccm folgender Nährlösung übertragen: Leitungswasser 100, $(NH_4)_2SO_4$ 0,2, Spuren von K_2HPO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ und $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ sowie eine Messerspitze voll $CaCO_3$. Hiervon kamen nach kräftigem Schütteln je 10 ccm in die 50 ccm fassenden Versuchskölbchen. Nach 24 Stunden wurden die Kulturen mit Diphenylamin-Schwefelsäure auf ihren Nitritgehalt untersucht, wobei nach Intensität der Blaufärbung unterschieden wurde zwischen 1 = sehr schwach, 2 = schwach, 3 = deutlich, 4 = stark und 5 = sehr stark. Hinsichtlich der genauen Bestimmung der wirklich gebildeten Nitritmengen gilt dasselbe wie für die Bestimmung der Essigsäure. Hier sind also die in die Darstellung eingetragenen absoluten Größen ebenfalls bedeutungslos. Wichtig sind nur die jeweiligen Differenzen zwischen den nH- und nHM-Werten.

In Ab. 24 sind zum Vergleich mit den 24 Stunden währenden Nitrifikationsversuchen gleichzeitig laufende Synäreseversuche aufgenommen und als Gegenstück zu den kurzfristigen Alkoholoxydationsversuchen zur selben Zeit durchgeführte Methylenblau-Reduktionsversuche mit *Bact. coli*. Der Wetterverlauf konnte nicht eingetragen werden, weil in der Zeit vom 30. 3. 1945 bis 30. 4. 1946 keine Wetterkarten erschienen sind.

Die nHM-Werte der Nitrifikation liegen fast immer über den nH-Werten, umgekehrt wie bei der Synärese. Die Nitrifikation wird also offenbar durch diejenigen Strahlungsverhältnisse begünstigt, durch welche die Synärese gehemmt wird. Diese bildete in der nH-Kurve

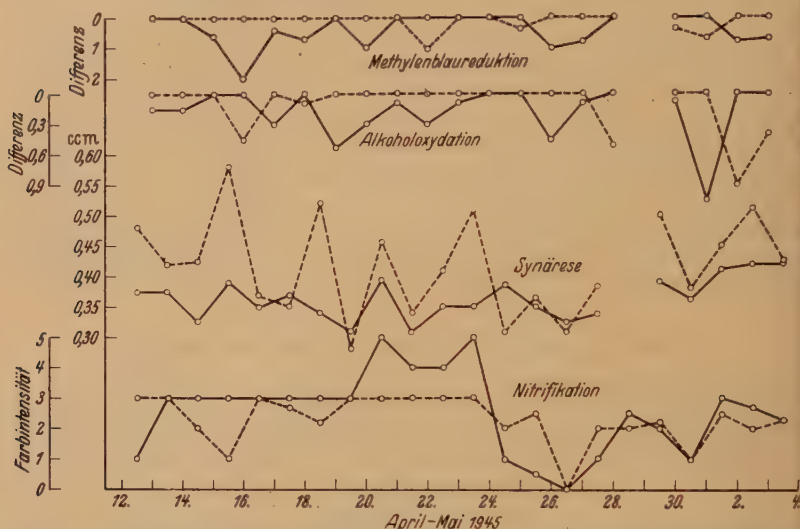


Abb. 24. Vergleich zwischen Methylenblau-Reduktion und Synärese einerseits sowie Alkohol-oxydation und Nitrifikation andererseits im Holzbrutschrank unter dem Hausdach (----) und darin unter 1 mm Messing bzw. ab 28. 4. unter 1 mm Messing + 1 mm Kupfer (—).

einige ausgeprägte Gipfel. An denselben Tagen sehen wir die nH-Werte der Nitrifikation besonders tief unter die nHM-Werte absinken, während umgekehrt die größte Annäherung beider an den Tagen mit Synärese-Minimalwerten erfolgt. Die biologische Oxydation des Ammoniaks zum Nitrit scheint also im Gegensatz zu Gärungen und Reduktionen durch T-Strahlung gehemmt zu werden.

Mit der nur wenige Stunden dauernden Alkoholoxydation zu Essigsäure verhält es sich im Wesentlichen genau so. Auch hier verlaufen die Kurvenpaare nH und nHM gegeneinander meistens umgekehrt wie diejenigen der Methylenblau-Reduktion. Nur gegen Ende des Monats April sind die Verhältnisse etwas unklar. Aber hier verhalten sich auch Synärese und Nitrifikation abweichend vom Vorhergehenden.

Ab 28. 4. wurden die Versuche mit stärkerem Metallschutz für nHM fortgesetzt. Zur 1 mm starken Messingschicht kam noch 1 mm Kupfer. Diese Maßnahme hatte offenbar zur Folge, daß zwar die Differenzen zwischen den gebildeten Essigsäuremengen in den beiden Kulturen nH und nHM größer wurden, zwischen den Nitritmengen und den Synäresewerten aber anscheinend geringer. Auch die Unterschiede zwischen den Reduktionswerten waren keineswegs deutlicher, sondern eher undeutlicher geworden. Vielleicht ist daraus wieder einmal zu entnehmen, daß jeder biologische Einzelvorgang auf einen ganz spezifischen, kleinen

Spektralbereich der Wetterstrahlung anspricht. Die Frage nach den genauen physikalischen Eigenschaften dieser jeweiligen Strahlen kann nur unter Zuhilfenahme physikalischer Methoden beantwortet werden.

Massenzuwachs bei Hefe.

Nun wird es auch verständlicher, warum der Massenzuwachs (*Azotobacter*) vor Hochdruckgebieten größer ist als vor Depressionen, nämlich weil dort die H-Strahlung überwiegt, wodurch die Zellatmung gefördert und deshalb mehr Kohlenstoff zum Aufbau anstatt zur Energiegewinnung verwendet werden kann. Denn auch bei nur geringen Mengen gebundenen Stickstoffs vor Depressionen ist der Zucker am Ende der Versuchszeit verbraucht, und es findet während eines Wetterwechsels vom Tief zum Hoch keine nachträgliche Stickstoffbindung mehr statt. Vor dem Tief sinkt der ökonomische Quotient. Also muß sich *Azotobacter* wie etwa die Hefe stoffwechselphysiologisch auch in qualitativer Hinsicht unter dem Einfluß der T-Strahlung anders verhalten haben, nämlich mehr gärend statt atmend. Entsprechende Ergebnisse waren demnach auch mit Hefe bei einem Vergleich zwischen Holz- und Metallbrutschrank zu erwarten.

So wurde z. B. in der Zeit vom 20. bis 30. 12. 1944 die Zahl der bei täglicher Erneuerung der Nährlösung gebildeten Hefezellen ermittelt. Als Nährlösung diente die gleiche, wie sie bei den Gärversuchen Verwendung fand. Sie wurde erst beimpft und dann nach kräftigem Durchschütteln zu je 10 ccm in Reagenzröhrchen verteilt. Nach 24 Stunden war die Gärung in jedem Falle beendet, und die Lösungen konnten ohne nennenswerten Verlust an Hefe vorsichtig abgossen und durch frische ersetzt werden.

Die Zellenzahl betrug

in M 560 000 000 bzw. 576 000 000 je ccm und
in nH 208 000 000 bzw. 208 000 000 je ccm.

In der Zeit vom 4. bis 13. 1. 1945 wurden gebildet

in M 464 000 000 bzw. 448 000 000 Zellen je ccm,
in H 400 000 000 bzw. 368 000 000 Zellen je ccm und
in nH 368 000 000 bzw. 288 000 000 Zellen je ccm.

In einer 24 Stunden alten Kultur wurden vom 29. zum 30. 1. 1945 gebildet
in nH 136 000 000 bzw. 112 000 000 Zellen je ccm und
in nHM (1 mm Messing) 112 000 000 bzw. 96 000 000 Zellen je ccm.

Die Stickstoffbindung und Entwicklung von *Azotobacter* konnte noch nicht an einer größeren Vergleichsreihe im Holz- und Metallbrutschrank untersucht werden.

Aspergillus niger.

Dafür bot aber *Aspergillus niger* ein leichter verwendbares Versuchsobjekt. Dieser Pilz wurde bezüglich des Mycelgewichts und der Menge und Farbtiefe gebildeter Sporen vergleichsweise im Holz- und Metallbrutschrank untersucht.

Er wurde in 50 ccm fassenden Erlenmeyerkolben auf je 10 ccm der gleichen Nährlösung gezüchtet, die auch für die Hefe-Gärversuche Ver-

wendung gefunden hatte. Die Sporen zur Beimpfung dieser Lösungen entstammten dem schwarzen Sporenrasen einer älteren Agarkultur. Nach drei bis vier Tagen Bebrütung wurde die Menge der gebildeten Sporen und ihre Farbe vermerkt und nach gründlichem Waschen mit Leitungswasser das Trockengewicht der Mycelien ermittelt. Die im Holzthermostaten mit Metall abgeschirmten Kulturen HM waren von einem 0,6 mm starken Nickelmantel umgeben.

Auch bei diesen Versuchen war wieder ein bestimmter Unterschied zwischen den Ergebnissen im Holz- und im Metallbrutschrank vorherrschend, nämlich reichlichere Sporenbildung und geringeres Mycelgewicht im Holzbrutschrank H (25.—28. 7., 11.—15. 8., 19.—23. 9. 1944 in Tabelle II). Daß häufig nur sehr geringe oder gar keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Kulturen zu erkennen waren, ist durchaus verständlich, da ja die Versuchszeit drei bis vier Tage währte, in welcher bei wechselndem Wetter ein Strahlungseinfluß durch einen anderen wieder ausgeglichen werden konnte (18.—21. 7. 1944).

Tabelle II. *Aspergillus niger* unter dem Einfluß der Wetterstrahlung in verschiedenen Brutschränken bei Ernährung mit organischer Stickstoffquelle

Versuchszeit	Bezeichnung	Trockengewicht in mg	Sporenmenge und -farbe
18.—21. 7. 1944	M	290 320	viel, braun
	HM	290 320	" , "
	H	300 300	" , wenig dunkler
25.—28. 7. 1944	M	220 240	am wenigsten, gelbbraun
	HM	170 170	" meisten, fast schwarz
	H	220 240	weniger, braun
11.—15. 8. 1944	M	290 300	fast keine
	HM	270 270	wenig, braun
	H	280 280	in der Mitte viel, schwarz
16.—20. 8. 1944	M	170 200	viel, schwarz
	HM	220 240	weniger, gelbbraun
	H	190 200	viel, dunkelbraun
19.—23. 9. 1944	M	290 290	ziemlich wenig, hellbraun
	HM	270 270	etwas mehr, etwas dunkler
	H	230 260	viel, olivbraun
5.—8. 3. 1945 *	M	620 620	sehr wenig
	nH	620 570	viel, gelblich
8.—11. 3. 1945 *	M	650 600	fast keine
	nH	550 570	sehr viel, olivgrün

* 20 ccm Nährlösung in 100 ccm fassenden Erlenmeyerkolben.

Die Unterschiede zwischen den Mycelarten im Holzbrutschrank nH unmittelbar unter dem Hausdach und im Metallbrutschrank M waren zuweilen noch größer und die Sporen dann in nH noch zahlreicher und

dunkler gefärbt (8.—11. 3. 1945 in Tab. 2). Aber auch zwischen diesen Kulturen waren häufig keine Unterschiede feststellbar (3.—6. 3. 1945).

Die Kulturen HM verhielten sich ihrem leichteren Metallschutz entsprechend gewöhnlich nicht so wie die M-Kulturen. Manchmal (z. B. 25.—28. 7. 1944) entwickelten sie sogar am wenigsten Mycel und die meisten und am besten ausgefärbten Sporen, wie sie andererseits auch eine fast vollständige Umkehrung der für Dänemark in den angezogenen Versuchszeiten als typisch geschilderten Verhältnisse bringen konnten, z. B. im viertägigen Versuch vom 16.—20. 8. Hier lieferte HM die höchsten Mycelernten und M die niedrigsten.

Über etwaige für bestimmte Entwicklungstypen zutreffende Wetter- und Strahlungsverhältnisse kann vorläufig noch nichts ausgesagt werden. Jedoch sehen wir in den meisten Fällen hinter Metall einen größeren Massenzuwachs und eine stärkere Zellvermehrung, also eine bessere Assimilation als hinter Holz, wo anscheinend weiche T-Strahlung all zu sehr fördernd auf dissimilatorische Gärungsprozesse und hemmend auf die mehr Energie liefernde aerobe Atmung einwirkt, wodurch im Endeffekt der ökonomische Quotient sinkt.

Allerdings sind die Versuchsergebnisse scheinbar anders, wenn anstatt der Bouillon eine synthetische Nährlösung mit Nitrat als Stickstoffquelle verwendet wurde, die, abgesehen von den in Tabelle 3 erwähnten Änderungen, folgendermaßen zusammengesetzt war und zu je 25 ccm in 100 ccm fassenden Erlenmeyerkölbchen zur Anwendung kam: H_2O 100; Glykose 3; NaNO_3 0,3; K_2HPO_4 oder KH_2PO_4 0,1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,005; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,005. Solche Versuche wurden später in Aarhus (Dänemark) mit ursprünglich ganz anderer Zielsetzung durchgeführt.

Besonders schlecht entwickelte sich der Pilz mit Nitrat in nicht sterilisierter Nährlösung anscheinend zu Beginn einer Hochdruckwetterlage, während er gleichzeitig in sterilisierter besser wuchs (Tab. 3). Dieser Unterschied war, wie es schien, vor und in einem Tiefdruckbereich mehr oder weniger ganz aufgehoben. Vorläufig möchte ich dieses Verhalten so erklären, daß durch das Erhitzen der zuckerhaltigen Lösung etwas Nitrat reduziert und für den Pilz unmittelbar assimilierbar wird. Die Assimilation des Nitrastickstoffs selbst wäre dann also nur mit Hilfe von T-Strahlung möglich, was durch einen Vergleich zwischen Metall- und Holzbrutschrank noch wahrscheinlicher wurde. Der Gegensatz zu den oben erwähnten Versuchsergebnissen bezüglich des Massenzuwachses ist also nur ein scheinbarer, insofern die Nitratreduktion bei H-Strahlung gehemmt erscheint und damit natürlich auch die Gesamtentwicklung des Pilzes. Tatsächlich haben ja die Versuche über Methylenblaureduktion gelehrt, daß diese ebenfalls durch T-Strahlung gefördert und durch H-Strahlung gehemmt wird. Offenbar gilt diese Abhängigkeit auch für andere biologische Reduktionen. Endgültige Schlußfolgerungen sollen jedoch aus diesen ersten Tastversuchen noch nicht gezogen werden.

Tabelle III. *Aspergillus niger* unter dem Einfluß der Wetterstrahlung bei Ernährung mit Nitrat als Stickstoffquelle.

Versuchszeit 1946	Zusatzg. der Nährlösung	Vorbehandlung der Nährlösung	Brut- schrank	mg Trockengewicht	
				einzel	Mittel
5.—8. 1.	Glykose 5 NaNO ₃ , 0,5 K ₂ HPO ₄ — Zn	nicht erhitzt 30' 45° C	M	0 0 100 100	0 100
8.—11. 1	wie vorig.	nicht erhitzt 15' 100° C	M	100 160 160 180	130 170
11.—14. 1.	K ₂ HPO ₄ — Zn (NH ₄) ₂ SO ₄ NaNO ₃	nicht erhitzt 15' 100° C	M	100 110 110 —	105 110?
		nicht erhitzt 15' 100° C		0 0 50 70	0 60
15.—18. 1.	K ₂ HPO ₄	nicht erhitzt 15' 100° C	M	180 200 220 220	190 220
		nicht erhitzt 15' 100° C	H	150 — 210 210	150? 210
21.—24. 1.	KH ₂ PO ₄ K ₂ HPO ₄	nicht erhitzt 10' 100° C	H	80 50 220 200	65 210
		nicht erhitzt 10' 100° C		110 100 200 130	105 165
24.—27. 1.	KH ₂ PO ₄	nicht erhitzt 10' 100° C	M	250 250 230 240	250 235
		nicht erhitzt 10' 100° C	H	110 90 190 160	100 175
28.—31. 1.	KH ₂ PO ₄	nicht erhitzt 10' 100° C	M	220 240 230 240	230 235
		nicht erhitzt 10' 100° C	H	220 140 200 200	180 200
31. 1.—3. 2.	KH ₂ PO ₄	nicht erhitzt 10' 100° C	M	190 190 200 200	190 200
		nicht erhitzt 10' 100° C	H	170 120 160 160	145 160
3.—6. 2.	KH ₂ PO ₄	nicht erhitzt 10' 100° C	M	220 230 230 230	225 230
		nicht erhitzt 10' 100° C	H	220 180 200 210	200 205

Tabelle III. (Fortsetzung.)

Versuchszeit 1946	Zusetzg. der Nährlösung	Vorbehandlung der Nährlösung	Brut- schrank	mg Trockengewicht	
				einzel.	Mittel
6.—9. 2.	KH_2PO_4	nicht erhitzt	M	250 230	240
		10' 100° C		250 230	240
		nicht erhitzt	H	210 210	210
		10' 100° C		210 200	205
9.—12. 2.	KH_2PO_4	nicht erhitzt	M	200 200	200
		10' 100° C		190 200	195
		nicht erhitzt	H	200 110	155
		10' 100° C		160 160	160
12.—15. 2.	KH_2PO_4	nicht erhitzt	M	180 200	190
		aufgekocht		— 190	190?
		nicht erhitzt	H	150 110	130
		aufgekocht		140 180	160
15.—18. 2.	KH_2PO_4 — Zn + Zn	nicht erhitzt		60 60	60
		10' 100° C	H	250 160	205
		nicht erhitzt		70 120	95
		10' 100° C		190 190	190
20.—23. 2.	KH_2PO_4	nicht erhitzt	M	110 190	150
		10' 100° C		220 240	230
		nicht erhitzt	H	180 200	190
		10' 100° C		200 210	205

Corynebacterium diphtheriae.

Daß sich bei einer so tiefgreifenden Wirkung der Wetterstrahlung auf den gesamten Stoffwechsel wesentliche Veränderungen in Gestalt und Wirkung der Mikroorganismen ergeben müssen, liegt auf der Hand. Für den Menschen kann das von unmittelbarer Bedeutung sein, z. B. hinsichtlich der Entstehung und des Verlaufs von Infektionskrankheiten. Darum wurden auch einige pathogene Mikroorganismen, in erster Linie *Diphtheriebakterien*¹², in den verschiedenen Brutschränken miteinander verglichen.

Zur Zeit dieser Untersuchung trat in Jütland Diphtherie vielfach endemisch auf, so daß die Beschaffung virulenter Bakterienstämme keine Schwierigkeiten bereitete. Ein Tupfer mit dem Rachenabstrich eines frisch Erkrankten wurde zunächst auf CLAUBERG II-Agar (Blut-Blutglycerin-Tellurit-Bouillonagar) abgestrichen und dieser 24 Stunden bebrütet. Von einer einzelnen Diphtheriekolonie wurde dann auf LÖFFLERSche Serumplatten überimpft, die 24 Stunden in den Versuchsbrutschränken blieben, wovon dann

¹² Über den Einfluß der Wetterstrahlung auf bakterielle Pflanzenkrankheiten wird an anderer Stelle berichtet.

auf frische Serumplatten übertragen wurde usw. Auf einem und demselben Deckglas angelegte und nach NEISSER gleichzeitig gefärbte Ausstriche von den an einem Tage auf Serum gewachsenen Bakterienrasen dienten dann der mikroskopischen Untersuchung, wobei besonders auf das Vorhandensein der sogenannten Polkörnchen, daneben aber auch auf andere veränderliche Merkmale wie z. B. die Länge der Bakterien geachtet wurde.

Für die Kulturen HM wurde zunächst nach einem ausreichenden Schutz gegen die im Holzbrutschrank vermuteten wirksamen Anteile der T-Strahlung gesucht. Es stellte sich heraus (Abb. 25), daß 1 mm Aluminium + 0,7 mm Eisen nicht genügte, um den darunter befindlichen Kulturen ein Strahlenklima zu verschaffen, das dem im Metall-

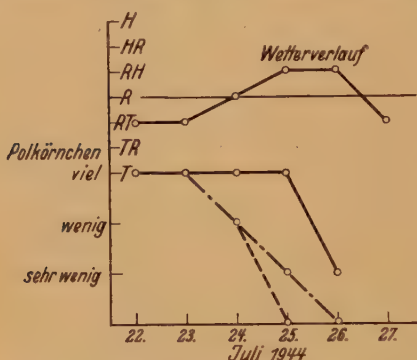


Abb. 25. Polkörnchenbildung in *Corynebacterium diphtheriae* im Holzbrutschrank (---), darin unter 1 mm Aluminium + 0,7 mm Eisen (— · —) und im Metallbrutschrank (—).

wurden in den folgenden Versuchen die Kulturen HM und nHM unter 4 mm Eisen und H und nH daraufgestellt. Aus der Wirkung dieser Anordnung kann entnommen werden, daß die in Frage stehende Strahlung von oben und nicht von unten kommt.

Als erstes Beispiel einer größeren Versuchsreihe sei diejenige vom 10.—25. 9. 1944 in Abb. 26 aufgeführt und Abb. 27 der polkörnchenhaltigen Zellen H vom 18.—19. (a) sowie der polkörnchenarmen HM vom 18.—19. (b) und der polkörnchenfreien und zerfallenen H vom 20.—21. (c) beigelegt.

Aus dieser Darstellung geht hervor, daß sich die Bakterien von typischen polkörnchenhaltigen zu atypischen polkörnchenfreien und wieder zu typischen Formen usw. entwickeln können. Ferner ist zu erwähnen, daß längere und sehr lange Zellen meistens dort angetroffen wurden, wo weniger oder keine Polkörnchen gebildet worden waren, es sei denn, daß die langen Zellen schließlich zerfielen, zu Kurzstäbchen degenerierten, wie es am Ende dieser Reihe im Holzbrutschrank der Fall war. Bisher konnte die Rückentwicklung einer offenbar so weit abgewandelten Form zur typischen Diphtherie nicht beobachtet werden.

Aus dem Wetterverlauf während der Versuchszeit wird geschlossen, daß die Bildung der charakteristischen Polkörnchen (Volutin) in den Zellen der *Diphtheriebakterien* von der Wetterstrahlung in den beiden Thermostaten bzw. unter dem Eisen im Holzbrutschrank folgender-

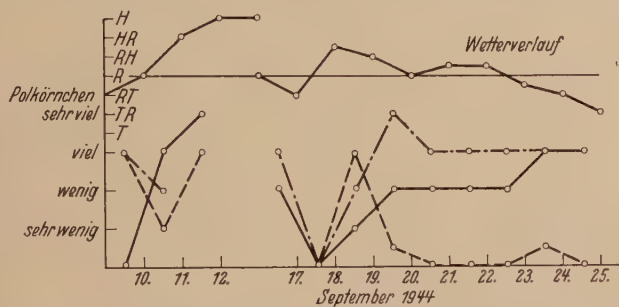


Abb. 26. Polkörnchenbildung in *Corynebacterium diphtheriae* im Holzbrutschrank (---), darin unter 4 mm Eisen (-.-.) und im Metallbrutschrank (—).

maßen abhängig war: Die typischen Stäbchen mit großen Polkörnchen entwickelten sich besonders zahlreich vor einem Hoch im Holzbrutschrank, vor einem Tief im Metallbrutschrank oder im Holzbrutschrank unter der Eisenplatte. Bei mittleren Wetterlagen und in einigen anderen

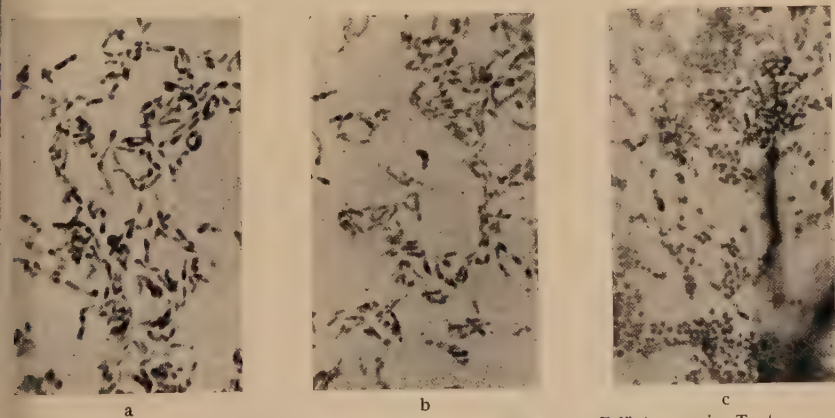


Abb. 27. Polkörnchenbildung in *Corynebacterium diphtheriae*. Erläuterung im Text.

besonders gelagerten Fällen verhielten sich die drei Kulturen mehr oder weniger gleich, teils mit mehr, teils mit weniger Polkörnchen.

Nach der gegebenen Theorie bedeutet das offenbar, daß die Entstehung der Polkörnchen durch bestimmte, relativ harte Teile der weichen T-Strahlung gehemmt wird, die bei ihrer geringen Durchdringungsfähigkeit wohl in den Holzbrutschrank, nicht aber unter die Eisenplatte oder gar in den Metallbrutschrank gelangen konnten. Hier

vermochten nur noch härtere Strahlen die wirksameren weichen her vorzurufen.

Die Langzelligkeit der unter dem Einfluß von T-Strahlung stehenden Bakterien wurde bei den verschiedensten Objekten immer wieder beobachtet und weiter oben bei *Spirillum volutans* ausführlich beschrieben. Dieses *Spirillum* schien auch bezüglich der Volutinbildung in ähnlicher Weise von der Wetterstrahlung abhängig zu sein wie die *Diphtherie bakterien*. Sicher trifft das auch für die Volutinbildung in Hefezellen vor der Kopulation zu (4). Somit ist die Bildung des Volutins wahrscheinlich in besonderem Maße von den Oxydationsleistungen der Zellen abhängig und steht vermutlich auch in engerer Beziehung zur geschlechtlichen Fortpflanzung.

Noch deutlicher als im Holzbrutschrank H tritt die hemmende Wirkung der T-Strahlung auf die Polkörnchenbildung im Thermostaten nH zutage. Das geht wohl am eindeutigsten hervor aus dem ungefähren gegensätzlichen Verlauf der beiden Kurven M und nH in Abb. 28, in der die auf CLAUBERG-Agar gewonnenen Ergebnisse nicht zu werten sind, weil hier die Polkörnchen niemals deutlich gebildet werden. Die beiden anderen Kurven H und nHM verlaufen ungefähr auf halber Höhe dazwischen, teils mehr der Kurve M, teils mehr der Kurve nH genähert. Der Gegensatz zwischen nH und M ist, wenn er auftritt, gewöhnlich so deutlich, daß sich daraufhin für die nächsten 24 Stunden die entsprechende Wetterprognose stellen läßt.

Im übrigen scheint auch aus diesen Kurven wieder hervorzugehen, daß die Strahlung vor einer Depression allmählich härter wird. Denn als erste fällt immer die Kurve nH ab, dann nHM und H und schließlich, wenn nH schon wieder einem Gipfel zustrebt, auch M. Sehr schön ist das auch an der Versuchsreihe der Abb. 29 zu sehen. Diese sollte jedoch in erster Linie der Klärung der Virulenzfrage dienen. Denn selbstverständlich mußte auch untersucht werden, wie weit etwa die morphologischen Veränderungen in den Bakterien mit solchen der Virulenz verknüpft waren.

Zu diesem Zwecke wurden drei bis vier Normalösen voll von den Bakterien in 2 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt und davon zwei weiblichen Meerschweinchen je 0,2 ccm intracutan am Bauch injiziert. Diese so beimpften Tiere blieben in einem Holzkäfig im Laboratorium.

Von den beiden mit M vom 20. 11. (Abb. 28) beimpften Tieren war das eine nach etwa 20 Stunden, das andere nach etwa 30 Stunden verendet. Die beiden mit nH beimpften dagegen erkrankten erst am 22. (keine FreBlust, fliegender Atem). Am 23. morgens waren auch diese tot. Der Sektionsbefund war typisch für eine Diphtherieintoxikation: Geschwollene und gerötete Nebennieren und reichlich blutig seröse Exudat in Bauch- und Brusthöhle. An der Einstichstelle war bei einem der Tiere ziemlich deutlich, bei den anderen kaum das sogenannte Kokardenphänomen erkennbar: Gelblich weiße Verfärbung unmittelbar am Einstich, umgeben zunächst von schwarzer, nekrotischer und außen von geröteter Zone.

Demnach wirkten beide Kulturen, M sowohl als auch nH, tödlich. Allerdings trat der Tod bei den nH-Tieren erst ungefähr zwei Tage später ein, also mit deutlicher Verzögerung. Man wird folglich annehmen müssen, daß die Virulenz dieser Bakterien wenigstens kurz nach der Injektion geringer

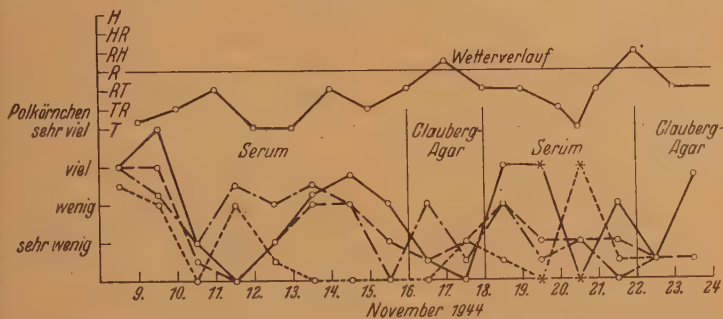


Abb. 28. Polkörnchenbildung in *Corynebacterium diphtheriae* im Holzbrutschrank unter dem Hausdach (----), darin unter 4 mm Eisen (—.—.), im Holzbrutschrank im 1. Stock desselben Hauses (——) und dort im Metallbrutschrank (——). * Tierversuch.

war als diejenige der M-Bakterien. Möglicherweise sind die nH-Bakterien im Tierkörper am 21. noch nicht vernichtet gewesen und dann bei der härteren Strahlung polkörnchenhaltig und virulent geworden genau so, wie wir am 21. auch eine Umkehr der Verhältnisse in den Plattenkulturen feststellen können, zurückzuführen auf einen schroffen Übergang von T- zu H-Strahlung. Bei gleichzeitiger Verimpfung filtrierter oder abgetöteter Kulturen hätte es sich zeigen müssen, ob etwa die schneller wirksame mehr Toxin enthielt als die andere.

Ab 22. hatten wir den umgekehrten Wetterverlauf, und die Strahlung wurde offensichtlich wieder weicher. Dem entspricht auch der Impferfolg am 21. Nur eins der mit nH beimpften Tiere verendete sehr schnell nach 22 Stunden, und zwar wie der Sektionsbefund zeigte, an Diphtherie. Das andere nH-Tier machte nur am 23. morgens einen etwas apathischen Eindruck, erholte sich dann aber wieder. Die beiden mit der M-Kultur beimpften Tiere verrieten überhaupt keine Beeinträchtigung ihrer Gesundheit, wenn man von dem am 26. bei Abbruch des Versuchs bei allen drei überlebenden Tieren um den Einstich herum festgestellten breiten nekrotischen Hof absieht.

Unter Einwirkung der allmählich weicher werdenden Strahlung war also die Virulenz der von vornherein schon polkörnchenfreien Bakterien bis auf die belanglose Nekrose ausgeschaltet und bei den anfangs polkörnchenhaltigen für das eine Tier noch zur tödlichen Wirkung, für das andere aber nur zu einer vorübergehenden leichteren Erkrankung ausreichend.

Weitere Impfversuche der obigen Art wurden am 2. und 4. 12. ausgeführt (Abb. 29). Von den am 2. geimpften Meerschweinchen waren am 8. noch alle sechs (je zwei M, nH und nHM) gesund und zeigten nicht einmal ein Symptom an der Injektionsstelle. Aber von den am 4. geimpften waren gegen alle Erwartung die beiden nH-Tiere am

6. unter den typischen Erscheinungen verendet, während die beiden M-Tiere überlebten und nur Nekrose und Rötung an der Impfstelle zeigten. Auf den ersten Blick erscheint das nach dem oben Gesagten unverständlich. Denn die M-Bakterien und nicht die nH-Bakterien ent-

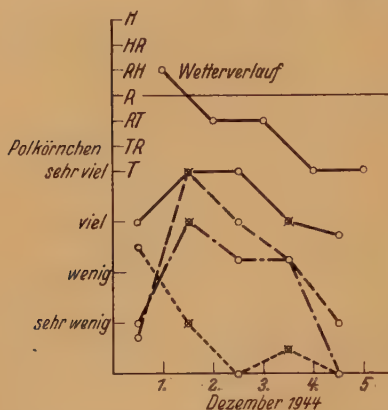


Abb. 29. Polkörnchenbildung in *Corynebacterium diphtheriae* im Holzbrutschrank unter dem Hausdach (---), darin unter 4 mm Eisen (— · — · —), im Holzbrutschrank im 1. Stock desselben Hauses (— · — · —) und dort im Metallbrutschrank (— · — · —). * Tierversuch.

ständiges Zwischenhoch. Jetzt dürften die Tiere durch die Tiefdruckeinwirkung in ihrer allgemeinen Resistenz wieder genügend geschwächt sein und die in ihnen noch nicht unschädlich gemachten Bakterien Toxin gebildet und sich stärker vermehrt haben, wobei aber in den mit polkörnchenhaltigen Bakterien M geimpften Tieren die Toxine von bereits vorhandenen Antitoxinen abgebunden wurden. Denn wahrscheinlich wurde diesen Meerschweinchen mit den Bakterien eine noch nicht tödliche Dosis Toxin verabfolgt, welche die Bildung von Antitoxinen anregte, was in den mit polkörnchenfreien Bakterien geimpften Tieren wahrscheinlich nicht in dem Maße geschehen konnte. Demnach hätte die Impfung mit den M-Bakterien ebenso gewirkt wie eine Schutzimpfung mit subletaler Dosis Diphtherietoxin. Diese Schlußfolgerungen werden auch durch folgenden Versuch gestützt:

Am 21. 5. (Abb. 30), als die Differenz im Polkörnchengehalt der Bakterien groß genug war, wurden von jeder Kultur zehn weibliche Meerschweinchen in der oben geschilderten Weise geimpft. Von diesen wurden dann jeweils fünf Tiere in mit Eternitziegeln abgedeckte Stallgebäude unter einer 4 mm dicken Eisenplatte gehalten, die anderen fünf im gleichen Gebäude ohne besondere Bedeckung.

Vor dem Impftag war das Wetter längere Zeit meistens schön, antizyklonal. Am 21. wurde es windig, und der Himmel bedeckte sich mit Cirren. Am 22. setzte Landregen ein, der am 23. in heftigen Schauerregen überging. Am 24. wurde es dann wieder sonnig, blieb aber weiterhin unbeständig mit Depressionen, am 26. und 29.

hielten reichlich Polkörnchen. Bei der Betrachtung des Wetterverlaufs berücksichtigt man aber den Wetterverlauf, so läßt sich unter Vorbehalt eine Erklärung für dieses Versuchsergebnis konstruieren.

Am 2. sind die Tiere auf der fallenden Wetterkurve mit nachfolgend anhaltendem Tief geimpft worden, so daß selbst die polkörnchenhaltigen Bakterien M, die schützenden Brutschrankmetalle beraubt, im Tierkörper keine nennenswerten Toxinmengen mehr bildeten. Hinzu kommt vielleicht noch, daß die Tiere infolge des vorausgegangenen Hochs besonders abwehrbereit waren [4].

Das Gleiche gilt zunächst noch für die Impfungen am 4. Aber vom 5. zum 6. ändert sich das Bild, die Strahlung wurde wieder härter, das Tief folgte anscheinend ein unbe-

Diesem Wetterverlauf entspricht auch zunächst einmal die nahezu polkörnchenfreie Entwicklung der Bakterien in nH am 21. unter dem Einfluß verstärkter T-Strahlung sowie der Erfolg der Impfung in den vier verschiedenen Tiergruppen: Am 22. waren noch alle 20 Meerschweinchen an-

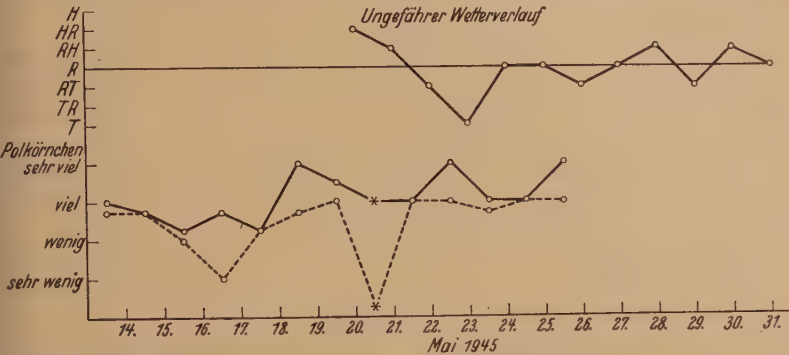


Abb. 30. Polkörnchenbildung in *Corynebacterium diphtheriae* im Holzbrutschrank unter dem Hausdach (---) und im Metallbrutschrank im 1. Stock desselben Hauses (—). * Tierversuch.

scheinend ganz gesund. Am 23. aber verendete schon morgens eines der M-Tiere unter Eisen und am Nachmittag am selben Ort zwei von den nH-Tieren, von denen zwei weitere deutlich krank waren. Auch von den nH-Tieren ohne Eisenbedeckung fielen zwei durch fliegenden Atem und Freßunlust als krank auf. An diesem Tage zog das Tief ab, durch welches die Versuchstiere in ihrer Abwehrkraft geschwächt wurden. Die in ihnen noch lebenden Bakterien waren schon wieder sehr virulent, so daß ihnen einige Tiere bereits erlagen, bezeichnenderweise vor allem mit polkörnchenfreien Bakterien geimpfte, die nach der oben gegebenen Theorie nicht genügend Antitoxin bilden konnten. Diese Impfgruppe hatte am folgenden Tage weitere Ausfälle. Leicht krank erschienen am Vormittag zwei M-Tiere, schwer krank zwei nH-Tiere und ein nH-Tier unter Eisen. Ein anderes dieser letzteren Gruppe schien nahe am Verenden zu sein. Beide nH-Tiere unter Eisen waren am Nachmittag tot, desgleichen ein nH-Tier ohne Eisen. Am 25. gab es bei dem depressiven Wettercharakter keine Verluste. Zwei M-Tiere und ein nH-Tier unter Eisen waren noch leicht, zwei nH-Tiere etwas deutlicher krank. Dagegen gab es am 26. abermals zwei Tote und zwar vormittags ein nH-Tier und abends das letzte nH-Tier unter Eisen. Die übrigen schienen dann alle bis auf die zwei noch immer kränkelnden M-Tiere die Krankheit überwunden zu haben. Ab 28. war nur noch ein M-Tier krank, das erst am 1. 6. morgens starb.

Dieses Tier zeigte ebenso wie die anderen verendeten kaum eine Hautreaktion an der Injektionsstelle, während die gesunden um so stärker Nekrose und Rötung aufwiesen, je schneller sie die Infektion überwandten. Es erübrigt sich zu betonen, daß der Sektionsbefund bei allen toten Tieren einwandfrei Diphtherie als Todesursache ergab.

Somit sind auch bei diesem Versuch, bei dem die Impfung wieder auf abfallender Wetterkurve erfolgte, abermals vor allem die mit polkörnchenfreien Bakterien geimpften Tiere der Infektion erlegen, näm-

lich 100 % nH unter Eisen und 40 % nH gegenüber je 20 % M und M unter Eisen. Warum die Eisenplatte die Mortalität noch erhöht hatte, ist nicht ohne weiteres ersichtlich. Es ist aber möglich, daß durch Abschirmung von T-Strahlung die Toxinbildung begünstigt wurde.

Umfangreichere Tierversuche unter Berücksichtigung des Toxin-gehalts der Bakterienkulturen und des Einflusses der Wetterstrahlung auf die geimpften Tiere würden dieses Problem wahrscheinlich noch mehr klären. Jedenfalls steht schon jetzt fest, daß die Erreger dieser Krankheit auf Änderungen der Wetterstrahlung sehr empfindlich reagieren¹³ und auch Diphtherieepidemien beim Menschen einen von dieser Strahlung stark abhängigen Verlauf nehmen [3], die ebenso als Ursache für die saisongebundenen Schwankungen in der zur aktiven Immunisierung notwendigen Impfstoffmenge [27] in Frage kommen dürfte.

Daß hier ebenso wie bei den anderen erwähnten Versuchen mit Kleinlebewesen noch so vieles problematisch bleiben muß und die gewonnenen Ergebnisse teilweise an Klarheit zu wünschen übrig lassen, während die Synäreseversuche viel beweiskräftiger sind, ist nicht weiter erstaunlich. Denn in diesem letzteren Falle handelt es sich um einen verhältnismäßig einfachen, weil toten, physikalisch-chemischen Detektor. Ein lebender Organismus, auch wenn es sich nur um einen Einzeller handelt, ist doch immer ein wesentlich komplizierteres Objekt.

Schlußbetrachtungen.

Eine mehr meteorologische Frage, die sich im Anschluß an die Versuche aufdrängt, ist die, ob nur das Wetter die Strahlung beeinflusst (Massenwirkung der Atmosphäre), oder auch umgekehrt das Wetter von der Strahlung beeinflusst wird. B. und T. DÜLL sehen diese letztere Beziehung als tatsächlich bestehend an, und KOPPE [23, 24] ist kürzlich der exakte Nachweis gelungen, daß der Luftdruck kalendermäßig gebundenen rhythmischen Schwingungen unterliegt, die sich im Gleichlauf mit der an der Zahl der Sonnenflecken gemessenen Sonnenaktivität befinden, also mit solarer Strahlung. Die Sonnenaktivität wird ihrerseits durch die Umläufe der Planeten gesteuert. Auch wenn man die hier und früher veröffentlichten Versuche mit Mikroorganismen darauf hin durchsieht, bekommt man den Eindruck, daß die Strahlung das Übergeordnete ist, welches sowohl das Wetter als auch die Lebensvorgänge steuert. Sehr eindrucksvoll in dieser Beziehung sind z. B. die schon früher mitgeteilten Beobachtungen über die Schwärmfreudigkeit der Bakterien und folgende Änderungen in der Bewölkung [4] sowie von den hier beschriebenen Versuchen z. B. diejenigen, die sich mit den Änderungen in der Zelllänge von *Spirillum volutans* befassen, und auch

¹³ Ende 1945 in Aarhus (Dänemark) ausgeführte Diphtherie-Versuche ergaben, daß zwar zwei verschiedene Stämme bezüglich ihrer Fähigkeit zur Polkörnerbildung an sich stark voneinander abweichen können, daß aber ihr Verhalten gegenüber dem Wetterverlauf dennoch grundsätzlich das gleiche ist, wie es im Vorstehenden geschildert wurde.

Die starke Beschleunigung der Synärese, die auf plötzliches Einsetzen verstärkter Strahlung vor ausgeprägten Wetterstürzen schließen läßt. Dieses allgemein feststellbare Vorseilen der biologischen und sonstigen Reaktionen vor den meteorologischen spricht ohne Zweifel für die übergeordnete Rolle der Strahlung als gemeinsame Ursache für beide, wenn nicht ein noch anderer Vorgang sowohl die Strahlung und damit die biologischen Vorgänge als auch das Wetter steuert. Mit solchen Annahmen läßt sich auch die von DE RUDDER [30, 31, 32] bereits hervorgehobene Tatsache, daß die biologischen Reaktionen nicht so sehr an bestimmte Wetterlagen gebunden sind als vielmehr an die Wetterdynamik, sehr gut erklären.

Andererseits ist es durchaus wahrscheinlich, daß schon beginnende Umschichtungen in der oberen Atmosphäre, die auf der Erdoberfläche noch nicht registriert werden, Intensität und Zusammensetzung der Wetterstrahlung beeinflussen. Denn daß die Intensität und Zusammensetzung der Ultrastrahlung und ihrer Folgestralen durch die Überschichtungen und Durchmischungen in der Atmosphäre bereits vor den Zyklonen und Antizyklonen am Erdboden meßbar verändert wird, steht fest¹⁴. So ist auch eine etwaige Beeinflussung der Wetterstrahlung, die mit Teilen dieser eben genannten Strahlung identisch sein dürfte, durch Beschaffenheitsänderungen in den elektrischen Beschleunigungsfeldern der Ionosphäre und der Gewitterwolken sowie durch Temperatur- und Feuchtigkeitsschichtungen in der Troposphäre, durch Höhengswankungen der die Mesotronen erzeugenden Schicht, durch die mittlere Temperatur der darunter liegenden Luftmasse usw. usw. sehr wohl in Erwägung zu ziehen¹⁵. Schließlich und endlich ist es manchmal überhaupt sehr schwer oder noch unmöglich, Ursache und Wirkung in atmosphärischen Vorgängen zu unterscheiden. Nach SCHMAUSS [33] ist z. B. von dem in Höhen über 12 km nachweisbaren, durch kosmische Strahlung entstehenden Ozon in polaren Gegenden mehr vorhanden als in äquatorialen, aber auch im rückwärtigen Gebiet eines Tiefs mehr als vor einem Tief. Man kann nun fragen: Ist hier der höhere Ozongehalt, also vielleicht auch eine stärkere Strahlung Ursache oder Wirkung des Tiefs, das in der Höhe polare Luftmassen heranzführt?

Aus sehr vielen der vorstehenden Versuchsergebnisse mußte die Schlußfolgerung gezogen werden, daß die Strahlung durchschnittlich vor einem Tief zunächst relativ weich ist und dann allmählich härter wird. Dieser Umstand spricht ebenfalls sehr für eine Massenwirkung der Atmosphäre auf die Wetterstrahlung, deren energiereiche Teile im massendichteren Hoch stärker abgebremst und mehr in weiche Strahlen umgewandelt werden als in Gebieten niedrigen Luftdrucks. Damit läßt sich auch die Beobachtung erklären, daß manchmal vor Depressionen, vielleicht wenn diese sehr schnell ziehen, nicht nur die weiche

¹⁴ Laut brieflicher Mitteilung von Herrn Dr. JULES aus dem Institut für theoretische Physik der Universität Berlin.

¹⁵ Nach brieflicher Mitteilung von Herrn Dr. DÜLL aus dem geophysikalischen Institut der Universität Frankfurt a. M.

T-Strahlung, sondern auch die harte H-Strahlung an Intensität zu zunehmen scheint.

Alles in allem genommen wird wohl die Auffassung, daß die Strahlung und die sonstigen Beschaffenheiten in der Atmosphäre vielfach und wechselseitig zueinander in Beziehung treten, der Wirklichkeit am nächsten kommen.

DÜLLS Statistiken über biologische Ereignisse, etwa über die Zahl der Todesfälle, verlaufen im Gleichklang mit den Eruptionen auf der Sonne. Die wirksame Strahlung wird also wenigstens teilweise auf der Sonne ihren Ursprung haben. Dafür spricht auch so manche andere Tatsache wie z. B. der tägliche Gang des Luftdrucks, der Körperwärme und, wie FINDEISEN zeigen konnte, der Synärese. Als mikrobiologische Beispiele wären zu nennen *Pseudoperonospora humuli*, die ihre Konidien in 24-stündigen Perioden bildet [42], sowie die oft zu beobachtende Intensivierung der Bakterienschwärmertätigkeit in den späteren Nachmittagsstunden, der dann gewöhnlich auch eine Abnahme der Bewölkung folgt [4]. Außer diesen täglichen Perioden gibt es aber noch größere. Eine fünf- bis siebentägige Periode spielt nach SCHMAUSS und FLOHN [18] in der Meteorologie insofern eine große Rolle, als die mittlere Dauer einer Großwetterlage fünf bis sieben Tage beträgt. FLOHN [18] macht ferner auf eine deutliche Periodizität in der jährlichen Verteilung der sogenannten Wettersingularitäten, vor allem der charakteristischen Hochdruckwetterlagen aufmerksam. Sie sind spiegelbildlich zu den Sonnenwenden als Spiegelpunkte angeordnet, wodurch sich wieder der Einfluß der Sonne zu erkennen gibt. Die Wärmestrahlung kommt hier nicht als Ursache in Frage. Der Periodizität liegt vielmehr eine Schwingung in der Stratosphäre zu Grunde, die ihrerseits wieder nach DÜLL und nach KOPPE von solarer Strahlung hervorgerufen wird.

Auch die eigenen Ermittlungen über die Synärese des Agars deuten auf eine gewisse Periodizität in den Maxima der Alterungsbeschleunigung hin. Bei den Berliner Versuchen ist das allerdings nur sehr undeutlich. Aber bei den in Kirowograd unter freiem Himmel ermittelten Synärese-Werten wiederholen sich die deutlichen Maxima abwechselnd nach etwa neun und fünf Tagen, nämlich um Vollmond, Neumond und fünf Tage danach¹⁶. Vorläufig sind jedoch die Versuchsreihen für irgendwelche Schlußfolgerungen noch zu kurz, und selbst in dieser kurzen Zeit sind schon einige Unterbrechungen in den fünf- und neun-tägigen Perioden zu verzeichnen. Immerhin ist die Regelmäßigkeit in der Wiederkehr der Maxima und Minima der Kirowograder Synärese-Kurven auffallend und verdient weitere Beachtung.

Nach allem läßt sich auf Grund der hier mitgeteilten Untersuchungsergebnisse im Verein mit denjenigen von DÜLL, FLOHN, FINDEISEN und KOPPE bereits ein vorläufiges Bild von den Zusammenhängen zwischen

¹⁶ Neue Versuche in Braunschweig ergaben keine Beziehung zum Mondphasenwechsel.

Strahlung, Wetter und biologischen Vorgängen zeichnen: Die von der Sonne oder aus dem Weltraum kommende primäre Strahlung wird bereits in der Ionosphäre zum größeren Teil in Folgestrahlung umgewandelt, wobei auch die periodischen Schwingungen in der Stratosphäre entstehen dürften. Diese pflanzen sich in die Troposphäre fort und bestimmen so das Großwetter. Daneben wird aber das Wetter (z. B. kurzfristige Bewölkungszu- und -abnahme) auch noch durch verschiedene Folgestrahlen beeinflußt werden. Andererseits erfährt die Strahlung wieder verschiedene Veränderungen durch die Schichtungen und sonstigen Verhältnisse in der Atmosphäre. Schließlich gelangen nur noch wenige der sehr harten Primärstrahlen und mehr weiche und sehr weiche Folgestrahlen in die Biosphäre, wo sie die geschilderten Reaktionen auslösen, vermutlich auf quantenbiologischem Wege, d. h. über mikrophysikalische Prozesse, die durch Treffer einzelner Strahlenquanten induziert werden [20]. Es entspricht also der hieraus abzuleitenden Erwartung, daß nicht alle Individuen einer Population auf eine bestimmte Wetterstrahlung zur gleichen Zeit in gleicher Weise reagieren.

Daß manche biologische Reaktionen, z. B. Polkörnchenbildung der Diphtheriebakterien, im Metallbrutschrank gegenüber der gleichen Reaktion im Holzbrutschrank bei kommendem Hoch gehemmt oder gar nicht und bei kommendem Tief intensiver ablaufen, steht nur scheinbar im Gegensatz zu früheren Feststellungen im Metallbrutschrank. Denn bei starken Antizyklonen, wenn die Strahlung hart genug ist, verlaufen derartige Reaktionen im Metallbrutschrank genau so intensiv wie im Holzbrutschrank. In diesem tritt also die gleiche Reaktion nur entweder früher ein als im Metallbrutschrank, nämlich vor einem Tief, und zwar dann, wenn die Strahlung noch ganz weich ist, so daß sie im Metallbrutschrank noch nicht zur Wirkung kommen kann, oder deutlicher vor einem Hoch, wenn dieses, wie es scheint, nur schwach ist und jedenfalls die Strahlung nicht so hart, daß die kupfernen Wände des Metallbrutchranks ohne Bildung hemmender weicher Strahlen durchschlagen würden.

In gewisser Hinsicht verhalten sich deshalb die verschiedenen belebten und unbelebten Detektoren im Holzbrutschrank ähnlich wie im schweren Panzer, in welchem als Folge von Treffern durch sehr energiereiche Teilchen etwa so viel weiche Strahlung zur Wirkung kommt wie im Holzbrutschrank unter dem Hausdach mehr unmittelbar. So waren z. B. im Brutschrank nH wie im schweren Panzer die Bakterien meistens länger, die Synäresewerte größer und die Volutinbildung geringer als im gewöhnlichen Metallbrutschrank. Dieser wird also im Punkte Wetterstrahlung den natürlichen Verhältnissen am wenigsten gerecht.

Warum die weichen Anteile der Wetterstrahlung an zyklonales und die härteren an antizyklonales Wetter gebunden zu sein scheinen, ist vorläufig noch nicht ganz klar zu sehen. Immerhin übt das Hoch, wie

schon gesagt, vermöge seiner dichtereren Masse eine stärkere Bremswirkung auf die Strahlung aus, so daß auf der Rückseite desselben vom dem Tief mehr weiche und weichste Strahlen zu uns gelangen als in diesem und am Fuße eines kommenden Hochs. Ob dieses der einzige und tatsächliche Grund ist für die Zuordnung überwiegend weiche Strahlung zum kommenden Tief und überwiegend harter zum kommenden Hoch, ist fraglich, wenn nicht sogar unwahrscheinlich. Denn in diesem Falle würde auch entgegen allen Feststellungen am vorderen Hang und auf dem Rücken eines beständigen, lange anhaltenden Hochs intensive weiche Strahlung verzeichnet werden. Man wird also, wenn man obige Frage bejahen will, wenigstens die zusätzliche Annahme machen müssen, daß bei einer wie eben erwähnten Wetterlage die gesamte Wetterstrahlung besonders schwach ist und erst unmittelbar vor und mit dem Abbau des Hochs wieder stärker einsetzt. Hierfür liegen jedoch noch keine ausreichenden Beweise vor, obschon eine solche Annahme mit anderen Untersuchungsergebnissen des Verfassers und DÜLLS sehr gut übereinstimmt [3, S. 322].

Wenn somit auch keine endgültige und volle Klarheit in den angeschnittenen Fragen erreicht werden konnte, so zeigen doch die Versuchsergebnisse wieder einmal, wie eng die biologischen und meteorologischen Geschehnisse mit den kosmischen verknüpft sind. Der meteorologische Gleichklang, dessen eigentliche Ursache, ihrem bisherigen geheimnisvollen Dunkel zwar nicht völlig entrückt, sich als kosmische (z. T. wahrscheinlich solare) Strahlung deuten läßt, wäre letztlich nur eine uns bislang unbekannt gebliebene Form der energetischen Abhängigkeit terrestrischen Geschehens von der Sonne oder dem gesamten Kosmos. In dem hier in Betracht kommenden Teil des gewaltigen Energiestromes, der sich dauernd auf die Erde ergießt, sind neben biologisch unwirksamen Strahlen auch solche enthalten, die auf die vitalen Prozesse teils hemmend, teils fördernd wirken, vielleicht sogar für einige unentbehrlich sind. Darum ist wohl die Forderung berechtigt, daß man künftig keine biologischen Versuche mehr ohne gebührende Berücksichtigung der Wetterstrahlung durchführen sollte.

Biologisch bedeutungsvoll scheint auch der ständige Wechsel zwischen H- und T-Strahlung und zwischen den Bestandteilen dieser beiden großen Gruppen der Wetterstrahlung zu sein. Denn aus den bisher vorliegenden Versuchsergebnissen läßt sich unter Vorbehalt schließen, daß die H-Strahlung biologische Oxydationsprozesse, diaerobe Atmung und alles, was damit eng zusammenhängt, wie z. B. die sexuelle Fortpflanzung¹⁷, fördert oder nicht hemmt (Leuchtkraft von *Vibrio Dunbar*, Nitrifikation, „Sternbildung“ von *Pseudomonas tumefaciens*, Volutinbildung, Zoosporenbildung von *Phytophthora infestans*).

¹⁷ Auch die sexuelle Potenz des Menschen ist vor Hochdruckgebieten gesteigert. Das kann unter anderem schon aus den Geburtenhäufungen in gewissen Monaten und den 9 Monate davor regelmäßig auftretenden Hochdruckgebieten abgeleitet werden, z. B. das Mai-Hoch und die Geburtenhäufung im Februar.

usw.), die T-Strahlung dagegen Reduktionsprozesse, Aggregationen, Synthesen und ihre unmittelbaren Folgen wie z. B. das Wachstum fördert oder nicht hemmt (Langzeitigkeit der Bakterien, Synärese, Gärungen, Methylenblaureduktion usw.). Das deckt sich übrigens sehr gut mit den Feststellungen EUGSTERS und seiner Mitarbeiter [13, 14, 15] über die biologische Wirkung der kosmischen Strahlung. Er fand, daß bei reger Schauerbildung hinter 18 mm Blei (der T-Strahlung vergleichbar) z. B. die Sporenkeimung und Entwicklung von Bakterien gehemmt werden und bei Kaninchen nach längerer Zeit sogar Sterilität eintritt, während umgekehrt das reine Wachstum von Mäusecarcinom stimuliert wird. Die „endogene“ Tagesrhythmik der Pflanzen [6] hat ihren Motor vielleicht auch in der Wetterstrahlung, die durchschnittlich am Tage mehr die Synthesen fördernde T-Strahlen, nachts mehr die aerobe Atmung fördernde H-Strahlen enthält. Die Gesamtentwicklung eines Organismus, wie sie z. B. in den von *Azotobacter* gebundenen Stickstoffmengen zum Ausdruck kommt, muß demnach durch eine Strahlungsmischung oder -folge gefördert werden, die auf beide Gruppen gegensätzlicher Lebensreaktionen günstig einwirkt, und zwar je nach Art des Individuums manchmal mehr auf die eine und manchmal mehr auf die andere. Stärkste Bakterienvermehrung und größte Hafer-Keimprozentefanden EUGSTER und HAUPTMANN [15] bei schwächster Gesamtstrahlung.

Die gegensätzlichen biologischen Wirkungen der H- und T-Strahlen auf Oxydation und Reduktion werden noch unterstrichen durch die neuesten Veröffentlichungen CURRY's [7, 8], der in bodennaher Kaltluft (Hoch) mehr Ozon und Ozonide feststellen konnte als in bodennaher Warmluft (Tief). Auf die Bedeutung des durch Strahlung gebildeten aktiven Sauerstoffs der Atmosphäre hat schon DORNO [9] hingewiesen. Allerdings kann den Schlußfolgerungen CURRY's unter anderem auch darin nicht beigeprflichtet werden, daß die biologische Wetterwirkung nur auf Ozon und Ozonide zurückzuführen sei, die in der 25 km-Schicht entstehen und erst nach unten transportiert werden müßten, und daß die Strahlung selbst für die biologischen Erscheinungen bedeutungslos sei. Dazu reagieren die Organismen viel zu schnell, auch bei völligem Abschluß von der Außenluft und in deutlicher Abhängigkeit von verschiedenen Strahlenpanzern. Deshalb muß das biologische Wirkungsfeld der Strahlung in Nähe der Organismen und Zellen oder in diesen selbst liegen. SCHULZE [35] ist zwar mit anderen der Auffassung, daß nur der Bereich vom sichtbaren Sonnenlicht bis ins Ultraviolett und Ultrarot und allenfalls eine Hochfrequenzstrahlung an Gewitterfronten wegen ausreichender Bestrahlungsstärke biologisch wirksam sein könnten. Es dürfte aber ratsam sein, diese Frage vor einer physikalischen Identifizierung der Wetterstrahlung noch offen zu lassen.

In diesem Zusammenhang muß noch einmal die offenbare Inhomogenität der T- wie auch der H-Strahlung hervorgehoben werden, die unter anderem aus den verschiedenen Häufungslagen der Maxima und Minima der einzelnen untersuchten Reaktionen auf der Wetterkurve

hervorzugehen scheint, obwohl das auch an verschiedenen schneller Reagierfähigkeit der untersuchten Objekte liegen kann. So finden wir in den Metallbrutschrank- Kontrollreihen, bei denen immer die erwähnten Wirkungen des Metalls zu berücksichtigen sind, meistens die stärkste „Sternbildung“ in ziemlich schroffen Gipfeln am Fuße eines kommenden Hochrückens, die stärkste Stickstoffbindung dagegen im allmählichen An- und Abstieg vor dem Gipfel des Hochs. Danach kommen wir schon in den Bereich überwiegender reduktionsbeschleunigender Wirkungen. Auf dem Gipfel des Hochs, vor dem Abfall zum Tief begegnen wir am häufigsten extrem langen Spirillen und unmittelbar danach, fast zur gleichen Zeit, oft auch noch auf dem Gipfel des Hochs, den extrem großen Synäresewerten. Beide Maxima treten dann etwas weniger häufig und nicht so ausgeprägt nochmals in den Senken der Tiefdruckgebiete auf. Diese Gipfel zeigen also durch ihre eng benachbarte Lage und auch in ihrer Schroffheit, daß sie ursächlich nahe verwandt sein müssen. Die Minima aller vier Reaktionen häufen sich dort, wo im schweren Panzer die Maxima in der Regel aufzutreten pflegen, nämlich für die „Sternbildung“ vom Hochdruckgipfel absteigend bis in den Anfang des Tiefs und ähnlich für die Stickstoffbindung, nur vielleicht etwas später, nicht so sehr in Nähe des Hochs wie in Nähe des Tiefs. Für die Spirilllänge und die Synärese liegen dagegen die entsprechenden Kardinalzonen am häufigsten auf den ansteigenden Teilen der Wetterkurve.

Demnach wäre die verhältnismäßig reinste H-Strahlung zu Beginn eines Hochs anzunehmen, die dann mit steigender Wetterkurve mehr und mehr mit T-Strahlung durchsetzt wird, bis auf dem Gipfel des Hochrückens, unmittelbar vor Beginn des Druckfalles die verhältnismäßig reinste T-Strahlung erreicht ist. Mit Annäherung an das Tief nimmt diese dann offenbar wieder ab, um manchmal im Tief nochmals ein allerdings weniger starkes Maximum zu bilden. Andererseits muß aber auch die T-Strahlung auf dem abfallenden Ast der Wetterkurve durchschnittlich stärker sein als auf dem ansteigenden Ast, worauf weiter oben schon hingewiesen wurde. Wir kommen also am Ende dieses Gedankenganges wieder zu dem Schluß, daß die Wetterstrahlung bei steigendem Barometer insgesamt schwächer sein muß als bei fallendem, und daß also wahrscheinlich die stärkere Strahlung vor und in der Depression diese hervorruft bzw. erhält oder daß beide einem noch anderen, unbekannten Vorgang untergeordnet sind. Ein vorläufiges Übersichtsbild über die Verteilung der vorherrschenden Wetterstrahlung verschiedener Härte und Dichte, wie es sich zur Zeit aus den geschilderten Versuchsergebnissen und daran geknüpften Betrachtungen ergibt, möge Abb. 31 vermitteln.

Die noch verbliebenen Unklarheiten hätten sich wahrscheinlich weitgehend aufhellen lassen, wenn das ursprünglich gesteckte Ziel, der von biologisch wirksamen Strahlen freie Raum, mit den Panzern erreicht worden wäre. In einem solchen Raum müßten biologische

Reaktionen auf jeden Fall konstant und außerdem ungehemmt schnell und gründlich oder ungewöhnlich stark gehemmt oder gar nicht ablaufen, d. h. die Zellen müßten in diesem letzteren Falle des Ausschlusses lebensnotwendiger Strahlung zu Grunde gehen. Geplante neue



Abb. 31. Mutmaßliche Verteilung der vorherrschenden Wetterstrahlen verschiedener Härte von sehr hart (—) bis sehr weich (---).

Versuche, teils mit allerstärkster Panzerung, teils unter Ausschaltung jeglichen Filters kamen aus kriegsbedingten Gründen nicht mehr zur Durchführung.

Zusammenfassung.

Es wurde versucht, das wirksame Agens für das wettergebundene Verhalten der Lebewesen mit Hilfe von mikrobiologischen und physikochemischen Experimenten zu ermitteln. Dabei ergab sich zunächst, daß sich hermetisch verschlossene Kulturen von *Pseudomonas tumefaciens* dem Wetterverlauf gegenüber nicht anders verhalten als die wie üblich offen gehaltenen Kulturen.

Diese Feststellung führte zu zahlreichen Untersuchungen über die Wirkung verschiedener Strahlungsabschirmungen auf Synärese und mikrobielle Vorgänge verschiedenster Art, aus deren Ergebnissen folgende Vorstellung entwickelt wurde:

Das wirksame Agens meteorobiologischer Reaktionen ist eine Strahlung, die vorläufig als Wetterstrahlung bezeichnet wird und aus weichen und harten Anteilen besteht. Da der weichere den Tiefdruckgebieten und der härtere den Hochdruckgebieten zugeordnet erscheint, wird der erstere T-Strahlung und der letztere H-Strahlung genannt.

Die Metallschichten eines Panzers halten offenbar T-Strahlen zurück und wandeln H-Strahlen in T-Strahlen um, so daß sich die biologischen und sonstigen Objekte hinter Metall oft umgekehrt verhalten wie in ungepanzerten Kontrollen.

Mit dem Wetter ändert sich die Strahlung offenbar so, daß sie im Hoch unmittelbar vor dem Übergang in ein Tief am weichsten und synäretisch wirksamsten, während dieses Überganges allmählich härter und auf der Rückseite des Tiefs am härtesten ist. Beim erneuten Anstieg des Barometers wird die Strahlung vermutlich wieder etwas weicher, aber weniger dicht sein als vor und beim Druckfall. Sie scheint außerdem regional verschieden zu sein.

Von diesen Gesichtspunkten aus läßt sich die Abhängigkeit biologischen und physikochemischen Geschehens von der Wetterdynamik folgendermaßen deuten: T-Strahlung fördert biologische Reduktionen, Gärungen, Aggregationen sowie das Wachstum und hemmt biologische Oxydationen, die aerobe Atmung und Vorgänge der sexuellen Vermehrung, wobei offenbar jeder der untersuchten Einzelvorgänge auf einen ganz spezifischen Teil der Strahlung abgestimmt ist. H-Strahlung scheint umgekehrt oder gar nicht zu wirken. Mit der Atmungshemmung bei zunehmender T-Strahlung ist folgerichtig ein Sinken des ökonomischen Quotienten und eine Hemmung des Massenzuwachses verbunden.

Die Bedeutung der Wetterstrahlung für epidemiologische Fragen wird am Beispiel der Diphtherie gezeigt.

Literatur.

- [1] BERG, H.: Einführung in die Bioklimatologie. (Bonn 1947). — [2] BORTELS, H.: Meteorobiologische Untersuchungen an *Azotobacter*. Zentralbl. f. Bakt. Abt. II, **102**, 129—153 (1940). — [3] BORTELS, H.: Über Beziehungen zwischen epidemiologischem und meteorologischem Geschehen, unter besonderer experimenteller Berücksichtigung der Inhibinwirkung. Zentralbl. f. Bakt. Abt. II, **104**, 289—325 (1942). — [4] BORTELS, H.: Meteorobiologische Reaktionen einiger Mikroorganismen. Zentralbl. f. Bakt. Abt. II, **105**, 305—322 (1942). — [5] BORTELS, H.: Beziehungen zwischen den Lebensäußerungen einiger Mikroorganismen und dem Wetterverlauf. Forsch. u. Fortschr. **18**, 98—100 (1942). — [6] BÜNNING, E.: Die entwicklungsphysiologische Bedeutung der endogenen Tagesrhythmik bei den Pflanzen. Naturwiss. **33**, 271—274 (1946). — [7] CURRY, M.: Über Ursachen und Bedeutung der Wettereinflüsse auf den Organismus. Ärztl. Forschg. **2**, 81 (1948). — [8] CURRY, M.: Bioklimatik. Die Steuerung des gesunden und kranken Organismus durch die Atmosphäre (Amerie. Bioclim. Res. Inst. Riederau/Ammersee. 1948). — [9] DORNO, C.: Aktiver Sauerstoff. (Adsorption an Aerosolen und Wasserdampf.) Meteorolog. Zeitschr. **59**, 206—207 (1942). — [10] DÜLL, B.: Wetter und Gesundheit. Teil I. Die Reaktionszeitbestimmung als Testmethode zur Feststellung von Einflüssen des Wetters und der Sonnentätigkeit auf den gesunden Menschen. Wissensch. Forschungsber. **54** (1941) Dresden und Leipzig. — [11] DÜLL, B. u. T.: Statistik über die Abhängigkeit der Sterblichkeit von geophysikalischen und kosmischen Vorgängen. Med. meteorol. Stat. von F. LINKE u. B. DE RUDDER, 197—245 (1936) Berlin. — [12] DÜLL, B. u. T.: Kosmisch-physikalische Störungen der Ionosphäre, Troposphäre und Biosphäre. Bioklim. Beibl. **6**, 65—76 (1939). — [13] EUGSTER, J.: Zur Frage der biologischen Wirkung der harten Ultrastrahlung. Naturwiss. **26**, 78—79 (1938). — [14] EUGSTER, J., unter Mitarbeit von V. F. HESS: Die Weltraumstrahlung (kosmische Strahlung).

und ihre biologische Wirkung. (Zürich und Leipzig. 1940). — [15] EUGSTER, J. u. HAUPTMANN, W.: Durchdringende Umgebungsstrahlung und Zellwachstum. Mit besonderer Berücksichtigung der Hess'schen Ultrastrahlung und der Vorgänge im strahlenarmen Milieu. *Strahlentherapie* **49**, 223—237 (1934).

[16] FINDEISEN, E.: Experimentelle Untersuchungen über den Einfluß des Witterungsablaufs auf die Beständigkeit eines Kolloids. *Bioklim. Beibl.* **10**, 23—34 (1943). — [17] FLOHN, H.: Referat über BORTELS (3). *Bioklim. Beibl.* **9**, 162—163 (1942). — [18] FLOHN, H.: Kalendermäßige Bindungen im Wettergeschehen. *Naturwiss.* **30**, 718—728 (1942).

[19] GEIGER, H.: Über die kosmischen Strahlenschauer, insbesondere über die atmosphärischen Schauer. *Forsch. u. Fortschr.* **18**, 250—251 (1942).

[20] JORDAN, P.: Die Physik und das Geheimnis des organischen Lebens. *Die Wissensch. Braunschweig* **95** (1941).

[21] KAPLAN, R.: Spontane Mutabilität bei *Bacterium prodigiosum*. *Naturforschung.* **2b**, 308—312 (1947). — [22] KOLHÖRSTER, W.: Der Einfluß erdmagnetischer Störungen auf Intensität, Barometereffekt und Schwankungen zweiter Art der Höhenstrahlung. *Naturwissensch.* **26**, 218—219 (1938). — [23] KOPPE, H.: Markante Punkte, Spiegelungspunkte und Takte im jährlichen Luftdruckgang. *Meteorolog. Rundsch.* **1**, 385 (1948). — [24] KOPPE, H.: Kalendermäßige Bindung im Witterungsablauf und kosmische Steuerung. *Ann. d. Meteorolog.* **1948**, 294—301. — [25] KUNZE, G.: Sind die Witterungseinflüsse auf biologische Vorgänge lufterlektrisch bedingt? *Gerlands Beitr. z. Geophys.* **46**, 291 (1936).

[26] MIEHLNICKEL, E.: Höhenstrahlung (Ultrastrahlung). Dresden und Leipzig, 1938.

[27] PRIGGE, R.: Aktive Immunisierung gegen bakterielle Infektion. *Naturwiss.* **29**, 599—604 (1941).

[28] RIPPEL, A.: Über den Einfluß des wechselnden Barometerstandes auf den Verlauf der alkoholischen Gärung und biologische Vorgänge überhaupt. *Zentralbl. f. Bakt. Abt. II*, **47**, 225—229 (1917). — [29] RIPPEL, A.: Eisen-, Agar- und Humuswirkung bei *Azotobacter*. *Arch. f. Mikrobiol.* **7**, 500—597 (1936). — [30] DE RUDDER, B.: Allgemeine klinische Methodik bioklimatischer Untersuchungen. *Med.-meteorol. Stat. von F. LINKE und B. DE RUDDER*, 79—96 (1936) Berlin. — [31] DE RUDDER, B.: Grundriß einer Meteorobiologie des Menschen. *Wetter- und Jahreszeiteinflüsse*. Berlin, 1938. — [32] DE RUDDER, B.: Jahreszeit und Wetter in der Biologie des Menschen. *Naturwiss.* **26**, 672—676 (1938).

[33] SCHMAUSS, A.: Das Problem der Wettervorhersage. Leipzig, 1943. — [34] SCHOBER, R.: Luftstickstoffassimilation und Säurebildung bei *Aspergillus niger*. *Jahrb. f. wissensch. Botan.* **72**, 1—105 (1930). — [35] SCHULZE, R.: Die biologisch wirksamen Komponenten des Strahlungsklimas. *Naturwiss.* **34**, 238—246 (1947). — [36] SÖDING, H. u. H. FUNKE: Über Empfindlichkeitschwankungen des Hafertestes und ihre Beziehung zu Wetterfaktoren. *Jahrb. f. wissensch. Bot.* **90**, 1—24 (1942). — [37] STAPP, C. u. H. BORTELS: Azo-

tobakterwachstum und Stickstoffbindung in Abhängigkeit vom Wetter. Vorläufige Mitteilung. Zentralbl. f. Bakt. Abt. II, **94**, 497—499 (1936). — [38] STAPP, C. u. H. BORTELS: Der Pflanzenkrebs und sein Erreger, *Pseudomonas tumefaciens*. II. Mitt. Über den Lebenskreislauf von *Pseudomonas tumefaciens*. Zeitschr. f. Parasitenkde. **4**, 101—125 (1931). — [39] STEBNITZ, V. C. und H. H. SOMMER: Die Altersgerinnung von gezuckerter Kondensmilch. I. Jahreszeitliche Schwankungen. Journ. Dairy Sci. **18**, 757—768 (1935), Ref. Chem. Zentralbl. **1936**, I, 1535. — [40] STUBBE, H.: Der gegenwärtige Stand der Strahlengenetik. Naturwiss. **25**, 483—490, 500—506 (1937).

[41] WOLTERECK, H.: Klima, Wetter, Mensch. Leipzig, 1938.

[42] YARWOOD, C. E.: The relation of light to the diurnal cycle of sporulation of certain downy mildews. Journ. Agric. Res. **54**, 365—373 (1938).

(Aus der Versuchs- und Forschungsanstalt für Weinbau in Freiburg i. Br.)*

Der biologische Säureabbau im Wein.

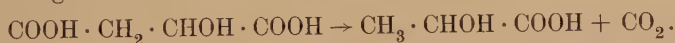
Von

KARL RIPPPEL.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 23. April 1948.)

Wein ist — ich denke dabei an die deutschen Qualitätserzeugnisse — das Produkt zweier biologischer Vorgänge, die sich in einem mehr oder weniger wohlqualifizierten Traubensaft beziehungsweise Jungwein abspielen. Zunächst setzt im Traubensaft eine alkoholische Gärung ein, deren Biologie seit etwa 100 Jahren bekannt ist und die wir hier nicht weiter erörtern wollen. Der zweite Vorgang, der für den geschmacklichen Ausbau unserer deutschen Weine eine wesentliche Rolle spielt, ist der sogenannte „biologische Säureabbau“, eine milchsaure Gärung, bei der — so ist die Auffassung bis heute gewesen — Äpfelsäure durch gewisse Bakterien glatt in Milchsäure und Kohlensäure zerlegt wird:



Dieser Zerfall bedingt im Wein eine Milderung des Säuregeschmacks, da ja die entstehende Milchsäure weniger stark dissoziiert ist als die Äpfelsäure. Dazu kommt der angenehm prickelnde Geschmack auf der Zunge, der besonders bei unseren Flaschenweinen geschätzt wird. Dieses geschmackliche Attribut entwickelt sich in der Weise, daß sich in dem bereits abgefüllten Wein noch ein restlicher Säureabbau vollzieht, so daß dieser mit dem dabei entstehenden Kohlendioxyd eine gewisse Anreicherung erfährt, sozusagen in ein Anfangsstadium von Sekt übergeführt wird. Diese Flaschen geben dann den „perlenden Wein“ mit dem prickelnden Geschmack, der besonders bei den Moselweinen beliebt ist. Die natürliche, vielfach zu kräftige Säure solcher Weine ist hinter dieser prickelnden Säure zusammen mit einem blumigen Bukett auf das beste getarnt.

So sehr nun der Kellermeister in der Lage ist, die alkoholische Gärung zu lenken und in ihrem Verlauf zu beeinflussen, so schwierig erscheint es vielfach, den biologischen Säureabbau in gewünschte Bahnen zu leiten, wobei besonders an jene Jahrgänge gedacht sei, die einen Säureabbau, das heißt eine Verminderung des Säuregeschmacks

* Die Arbeit wurde im wesentlichen an der Versuchs- und Forschungsanstalt für Weinbau in Freiburg i. Br. in den Jahren 1939—1942 durchgeführt.

im Wein, wünschenswert erscheinen lassen, so sehr auch umgekehrt ein zu kräftiger Säureabbau verhindert werden muß, da der Wein dadurch einen zu faden Geschmack annehmen würde.

Es ist also nicht überraschend, wenn das Problem „Säureabbau“ unseren deutschen Weinbau schon im vergangenen Jahrhundert beschäftigte. N. BOUSSINGAULT [1] hat bereits 1868 in Apfelweinen regelmäßig einen mehr oder weniger starken Rückgang der Säure festgestellt, ohne jedoch eine eindeutige Erklärung hierfür gefunden zu haben. Wir können heute wohl annehmen, daß es sich um einen biologischen Säureabbau handelte. Doch damals vermutete man, diese Beobachtung mit dem Ausscheiden von Weinsäure in Form von Weinstein erklären zu können, wenn auch die experimentelle Verfolgung dieser Frage zeigte, daß ein mit dem Ausscheiden der Weinsäure verbundener Säureschwund von nur einigen Promille zu gering ist, um den zuweilen beachtlichen Rückgang der Säure um 5—8 $\frac{1}{100}$ und mehr erklären zu können.

Der erste Hinweis, daß der zuweilen fade Geschmack in gewissen Weinen auf eine Milchsäuregärung beziehungsweise auf Mikroorganismen zurückgeführt werden könne, geht auf L. PASTEUR [2] zurück. Dann war es wohl P. KULISCH [3, 4, 5, 6, 7], der in einer Reihe von Aufsätzen an eine solche Möglichkeit dachte, besonders auf Grund seiner Beobachtungen, daß pasteurisierte Weine niemals einen Säurerückgang zeigten, weil eben in diesen durch das Erhitzen auf etwa 80° C die meisten Mikroben abgetötet werden. P. KULISCH machte für den Säurerückgang zunächst die Hefe verantwortlich. Ebenso glaubten J. WORTMANN [8, 9, 10, 11, 12], J. SCHUKOW [13, 14] und C. AMTHOR [15], daß Mikroorganismen, und zwar die *Hefe*, für den Säurerückgang im Wein verantwortlich zu machen seien. H. MÜLLER-THURGAU [16] gab zwar zunächst zu, daß *Hefe* mitunter ebenfalls für einen Säurerückgang im Wein in Frage kommen könne, blieb jedoch bei seiner Auffassung, daß bei stärkeren Säurerückgängen *Bakterien* beteiligt sein müßten, zumal er [17] schon 1891 davon berichtete, daß in solchen Weinen, die einen deutlichen Säurerückgang zeigten, reichlich *Bakterien* festgestellt werden konnten. Auch P. KULISCH [18] gab zu, daß mitunter noch andere Mikroben als *Hefen* organische Säuren verzehren könnten, hielt jedoch an seiner Vorstellung fest, daß für den Säurerückgang im Wein in erster Linie *Hefe* in Frage käme. Nach W. SEIFERT [19] vermag *Hefe* tatsächlich Äpfelsäure anzugreifen, führt diese aber nicht in Milchsäure über, sondern veratmet sie zu Kohlensäure und Wasser. Es ist erstaunlich, daß H. MÜLLER-THURGAU u. A. OSTERWALDER [16, 20, 21, 22] trotzdem bis zum Jahre 1912 immer wieder darauf hinweisen mußten, daß die durch *Hefe* verursachte Säureabnahme im Wein viel zu gering sei, als daß damit der oft bedeutende Säurerückgang eine ausreichende Erklärung finden könne.

A. KOCH [23, 24, 25, 26, 27] hat schließlich um die Jahrhundertwende den Nachweis erbracht, daß es sich beim biologischen Säureabbau tatsächlich um einen bakteriellen Vorgang handelt, was dann W. SEIFERT [28, 29, 30] bestätigte. Das von ihm isolierte Bakterium nannte er *Micrococcus malolacticus*. Er zeigte, daß dieses Bakterium Äpfelsäure in Milchsäure und Kohlensäure zerlegt, den Vorgang selbst bezeichnete er als Milchsäuregärung. Seine Vermutung, daß noch andere *Bakterien* in analoger Weise Äpfelsäure spalten würden, haben später H. MÜLLER-THURGAU u. A. OSTERWALDER [31, 33] bestätigt. Daß bei diesem Äpfelsäurezerfall im Wein Milchsäure entsteht,

haben auch R. KUNZ [34] und W. MÖSLINGER [35] gefunden, ohne allerdings auf die Ursache des Auftretens dieser Milchsäure einzugehen.

Jedenfalls war durch die Arbeiten von W. SEIFERT, A. KOCH und W. MÖSLINGER eine für den Weinbau wesentliche Frage dahingehend gelöst, daß der seit Jahrzehnten beobachtete Säurerückgang in jungen Weinen auf einem Zerfall von Äpfelsäure in Milchsäure und Kohlensäure beruht und daß dieser Vorgang auf bestimmte *Bakterien* zurückzuführen ist. Diese grundlegende Erkenntnis, vor allem die Arbeiten von A. KOCH und W. SEIFERT erfuhren durch die anschließenden ausgedehnten Untersuchungen von H. MÜLLER-THURGAU u. A. OSTERWALDER eine wesentliche Erweiterung. Beide Autoren isolierten noch eine Anzahl weiterer *Bakterien* [33], die ebenfalls Äpfelsäure in Milchsäure und Kohlensäure zerlegen. Heute können wir folgende für den Säureabbau wesentlichen *Bakterien* unterscheiden, die alle auffallend klein und fakultativ anaerober Natur sind.

Micrococcus malolacticus wurde von W. SEIFERT (l. c.) bereits 1901 isoliert. Dieses Bakterium hat einen Durchmesser von 1μ und ist meist zu Diplokokken, selten zu Tetraden vereinigt. Es spaltet Äpfelsäure in Milchsäure und Kohlensäure, wobei Spuren von flüchtiger Säure entstehen. Bei Anwesenheit von Glykose entwickelt es reichlich flüchtige Säure. Bei 12 bis 13 Volum-% Alkohol hört sein Wachstum auf, ebenso bei etwa 10 ‰ Säure.

Bacterium gracile wurde 1908 von H. MÜLLER-THURGAU u. A. OSTERWALDER [31] isoliert und beschrieben. Es handelt sich um Kurzstäbchen von 0,75 bis $1,0\mu$, die meist zu kürzeren oder längeren zarten Fäden verbunden sind, die oft scharf geknickt erscheinen und im Mikroskop wie Girlanden durch das Gesichtsfeld ziehen. Dieses Bakterium spaltet Äpfelsäure in Milchsäure und Kohlensäure, wobei ebenfalls Spuren flüchtiger Säure frei werden. Außerdem vermag es Zitronensäure in Milchsäure und reichlich flüchtige Säure zu zerlegen. Sind Glykose oder Fructose zugegen, so werden diese in Milchsäure, Essigsäure, Kohlensäure und Äthylalkohol abgebaut, wobei aus Fructose außerdem noch Mannit entsteht. Bemerkenswert ist die relativ hohe Resistenz dieses Bakteriums gegenüber organischen Säuren, verträgt es doch im Wein noch bis zu 18 ‰, während die übrigen säureabbauenden Bakterien schon bei etwa 10 ‰ Säure ihre Tätigkeit einstellen. Die Resistenz dieses Bakteriums gegenüber Alkohol ist weniger hoch, stellt es doch bei etwa 10 Volum-% sein Wachstum ein. Es sei betont, daß *Bacterium gracile* in unseren deutschen Weinen den Säureabbau im wesentlichen besorgt.

Micrococcus variococcus, von H. MÜLLER-THURGAU u. A. OSTERWALDER [32] beschrieben, hat einen Durchmesser von $0,7-1,5\mu$, ist meist zu Diplokokken und hin und wieder auch zu Tetraden, auch zu Zoogloen vereinigt. Es zerlegt ebenfalls Äpfelsäure in Milchsäure und Kohlensäure und bildet dabei Spuren von flüchtiger Säure. Aus Fructose und Glykose bildet es im wesentlichen Milchsäure. Bei 10 ‰ Äpfelsäure, ebenso bei 11 Volum-% Alkohol, stellt es sein Wachstum ein, so daß seine Entwicklungsmöglichkeit relativ bedingt ist.

Micrococcus acidovorax, ebenfalls von H. MÜLLER-THURGAU u. A. OSTERWALDER [32] isoliert, hat einen Durchmesser von $0,5-0,7\mu$ und ist, wie *M. variococcus* und *M. malolacticus* im allgemeinen zu Diplokokken verbunden. Auch dieses Bakterium spaltet Äpfelsäure in Milchsäure und Kohlensäure

und Spuren von flüchtiger Säure. Außerdem vermag es Maltose und Lactose anzugreifen. Es zeigt eine bemerkenswerte Resistenz gegen Alkohol, denn es bis zu 11,5—12 Volum-% und gegen Säure, die es bis zu 10 ‰ verträgt.

Bacterium intermedium wurde als letztes dieser Gruppe 1917 von H. MÜLLER-THURGAU u. A. OSTERWALDER [33] beschrieben. Es handelt sich um Kurzstäbchen von 1,2—1,5 μ Länge, die oft in langen Fäden zusammenhängen und dann als flockige Gebilde erscheinen. Es wird im Wein nur selten beobachtet und spielt eine untergeordnete Rolle. Es zerlegt Fructose in Milchsäure, Essigsäure, Kohlensäure und Mannit; Glykose und Saccharose in Milchsäure, Kohlensäure, wenig Essigsäure und Alkohol. Äpfelsäure wird in Milchsäure, Kohlensäure und Spuren von flüchtiger Säure zerlegt.

Der Vollständigkeit halber sei angeführt, daß durch einige der oben angeführten Bakterien, so auch *Bacterium gracile*, im Wein der sogenannte Milchsäurestich hervorgerufen werden kann. Die dabei entstehende Milchsäure entsteht aber nicht aus Äpfelsäure, es handelt sich vielmehr um den Abbau von Traubenzucker, wobei unter anderem relativ reichlich Milchsäure, sowie auch flüchtige Säure gebildet werden.

In unseren deutschen Weinbaugebieten wird der biologische Säureabbau, wie schon angeführt, vornehmlich von *Bacterium gracile* besorgt, was schon bei A. v. BABO u. E. MACH [36] angegeben wird. Dies mag damit zusammenhängen, daß dieses Bakterium, im Gegensatz zu den übrigen dieser Gruppe, am wenigsten säureempfindlich ist, ein Umstand, der bei unseren Weinen naturgemäß eine Rolle spielt, wo doch der Säuregehalt oft 12—15, mitunter bis zu 20 ‰ und mehr beträgt. In allen anderen Fällen, in welchen sich das Säuremaß um 10 ‰ und weniger bewegt, ist es wohl dem Zufall überlassen, welches der angeführten Bakterien den Säureabbau besorgt. Ich habe bei meinen Untersuchungen hin und wieder neben *Bacterium gracile* auch *Micrococcus acidovorax* beobachtet.

Eine nicht uninteressante Frage, die hier berührt werden mag, ist die von der Ökologie der Rebe und — wenn ich mich so ausdrücken darf — der Ökologie des Weines.

Die Heimat des Rebstockes ist im Mittelmeergebiet und Orient zu suchen. Dort reift die Weinbeere völlig aus. Sie enthält somit nur wenige organische Säuren und schmeckt rein süß. Es ist begreiflich, daß dort ein Säureabbau im Wein überhaupt keine Rolle spielt. Im Gegenteil, es wäre höchst unerwünscht, wenn ein solcher stattfände, setzt man doch vielfach, eben aus geschmacklichen Rücksichten, Weinsäure, Äpfelsäure oder Zitronensäure zu, um den Wein einerseits geschmacklich zu verbessern, ihn andererseits aber auch vor gewissen Krankheiten, besonders vor dem sogenannten Schwarzwerden oder Schwarzen Bruch, einer Ferritannat-ausfällung bei mangelnder Wein- oder Äpfelsäure, zu schützen.

Die Heimat der deutschen Qualitätsweine liegt am Rhein, an der Mosel und am Main, somit in gänzlich anderen Klimaten als jene am Mittelmeer und im Orient herrschenden. Die Ökologie der Rebe ist also eine gänzlich andere als die „Ökologie“ unserer Qualitätsweine.

Dies ist offenbar durch die Tatsache bedingt, daß die Weinbeere in unseren klimatisch begünstigten deutschen Landen wohl eine weitgehende, aber keine so vollkommene Ausreifung erfährt, wie dies aus begreiflichen Gründen in der Heimat des Rebstockes der Fall ist. Wohl wird in den Weinbeeren reichlich Zucker gebildet, aber dennoch verbleibt ein gewisser Teil an organischen Säuren, so viel, daß der wohlgeratene Wein auf der

Zunge angenehm mundet, bei weitem blumiger und bukettreicher als die mit Süße gesättigten Südweine. Dies auch dann, wenn der Winzer seinem Wein eine angemessene Zuckerung zukommen läßt; denn dadurch wird ja das naturgegebene Aroma nicht verwischt, im Gegenteil, es kann bei sachgemäßer Behandlung des Weines nur eine Steigerung erfahren. So mutet es immerhin bemerkenswert an, daß der Rebstock in Gegenden, die nicht seine Heimat sind, wertvollere Weine reifen läßt als in jenen Klimaten, die seiner Ökologie und Soziologie gemäß sind.

Nun zurück zum Säureabbau. Es ist nicht überraschend, wenn nach der Feststellung, daß für den Säureabbau bakterielle Einflüsse maßgeblich sind, entsprechende Maßnahmen ergriffen wurden, diesen Vorgang in der einen oder anderen Weise zu beeinflussen. Es ist ja die zweifache Aufgabe beziehungsweise Sorge des Winzers, entweder einen zu flotten Säureabbau abzustoppen oder einen erwünschten Säureabbau einzuleiten. Dazu ist zu bemerken, daß gerade in jenen Jahrgängen, die einen Säureabbau gut vertragen könnten, dieser meist sehr schwach und schleppend verläuft, mitunter sogar ausbleibt, wogegen in sehr sonnigen und säurearmen Jahrgängen, die also gar keinen Säureabbau nötig haben, ein solcher sich sehr kräftig, geradezu hemmungslos vollziehen kann.

Wohl stehen dem aufmerksamen Winzer beziehungsweise Kellermeister Mittel und Wege zur Verfügung, einen solchen stürmischen Abbau der Äpfelsäure zu stoppen: der fragliche Wein wird entweder entsprechend stark geschwefelt, wodurch die säureabbauenden Bakterien unschädlich gemacht werden, oder diese werden durch scharfes Filtrieren aus dem Wein entfernt. Anders gelagert ist aber die Situation im umgekehrten Falle, wenn also ein zu schwacher Säureabbau gefördert werden soll. Dies ist die eigentlich aktuelle Frage im Weinbau.

Seit den von A. KOCH und W. SEIFERT gewonnenen Erkenntnissen, daß für den Säureabbau *Bakterien* erforderlich sind, sucht man natürlich nach den Lebensbedingungen, die für die fraglichen Bakterien als optimal bezeichnet werden können beziehungsweise nach solchen Faktoren, welche die fragliche bakterielle Entwicklung in günstigem oder in ungünstigem Sinne zu beeinflussen vermögen. Man hat von Anfang an drei Einflußfaktoren geltend gemacht, ohne damit zu einem zufriedenstellenden Ergebnis zu gelangen: Den sogenannten „Hefetrub“, die Azidität des Weines und die Temperatur des Kellers, in welchem der Wein lagert.

Vor allem wird dem Hefetrub — es ist dies die nach beendeter alkoholischer Gärung sich am Boden des Fasses absetzende *Hefe* — ein maßgeblicher Einfluß auf die Entwicklung der säureabbauenden *Bakterien* zugeschrieben. Schon wenige Wochen nach beendeter Gärung stirbt ein beachtlicher Teil der im Faß gelagerten *Hefezellen* ab, geht in Autolyse über und gibt mit diesem Zellzerfall eine Reihe von Eiweißbruchstücken und sonstigen organischen Stoffen einschließlich Wirkstoffen an den Wein ab. Unter dem Einfluß dieser Abbaustoffe sollen sich die säureabbauenden *Bakterien* mehr oder weniger kräftig ent-

wickeln können, besonders nach dem Aufrühren dieses Hefetrubes, und damit einen Säureabbau einleiten beziehungsweise fördern. Diese Überlegung hört sich sehr überzeugend an und führt auch dann und wann zu einem Erfolg, doch sind die diesbezüglichen Angaben in der Literatur nicht übereinstimmend. Es wäre müßig, auf all die diesbezüglichen Literaturstellen hier näher einzugehen. Sie sind bei H. MÜLLER-THURGAU u. A. OSTERWALDER [33], A. GÜNTHER [37], F. SCHMITTHENNER u. C. v. D. HEIDE [38], A. v. BABO u. E. MACH [36] bis zu den jüngsten Darstellungen von E. KIELHÖFER [39] und H. SCHANDERL [40] zu finden.

Wenn der Hefetrub beziehungsweise autolytierte Hefe auf die Entwicklung der säureabbauenden *Bakterien* einen maßgeblichen Einfluß hätte, dann dürfte der Säureabbau überhaupt kein Problem sein; denn *Hefe* beziehungsweise Hefetrub ist ja im jungen Wein immer zugegen, es sei denn, daß dieser schon bald nach der Gärung von der *Hefe* weggenommen wird. Auf die Frage des „Hefetrub“ komme ich weiter unten nochmals zu sprechen.

An dieser Stelle sei auf eine Arbeit von K. HENNIG u. P. OHSKE [41] hingewiesen. Genannte Autoren wollen die für den Säureabbau maßgeblichen Eiweißbausteine isoliert haben, doch ist ihre Beweisführung kaum überzeugend, gehen sie doch von falschen Voraussetzungen aus. Sie berichten von „egalisiertem Most“, den sie in verschiedenen Fässern eingelagert und einer einheitlichen Gärung unterworfen haben, der aber trotzdem, wie angegeben wird, keinen gleichmäßigen Säureabbau zeigte. Es ist aber wohl unwahrscheinlich, daß in verschiedenen Mosten, wenn diese sorgfältig egalisiert waren und der Hefestoffwechsel gleichartig verlaufen ist, der Säureabbau verschiedene Ausmaße zeigen soll. Was für die *Hefe* gilt, trifft auch für die säureabbauenden *Bakterien* zu, das heißt, wenn die besagten Moste tatsächlich egalisiert waren, dann hätte, wenn exakte Arbeitsmethoden überhaupt noch einen Sinn haben sollen, wie die alkoholische Gärung, so auch der Säureabbau gleichartig verlaufen müssen. Außerdem — dies dürfte K. HENNIG nicht unbekannt sein — erfolgt ja im unvergorenen Traubensaft ebenfalls ein Säureabbau, wenn nur die biologischen Voraussetzungen für *Bacterium gracile* erfüllt sind, wenngleich hier keine von der autolytierten *Hefe* rührenden „Purine, Peptide und Aminosäuren“ zugegen sind, sondern lediglich die in der Sonne gereiften Nähr- und Wirkstoffe der Weinbeere. Auch H. SCHANDERL [42] will in seiner Erwiderung auf meine Arbeit [43, 44, 45] den Hefetrub für die Entwicklung des *Bacterium gracile* verantwortlich machen.

Was den Säuregrad des Weines anlangt, so möchte ich zunächst einige grundsätzliche Tatsachen über den Begriff „Säuregrad“ hervorheben.

Der Chemiker beziehungsweise Biologe unterscheidet zwei Arten von Azidität: Die aktuelle Azidität (Säuregrad), die in pH -Werten angegeben wird, und die potentielle Azidität (Säuregehalt), die durch Titrieren festgestellt und deshalb auch Titrationsazidität genannt wird. Zwischen aktueller und potentieller Azidität bestehen keine unmittelbaren Beziehungen, zumal ja für letztere das Maß der Pufferung eine entscheidende Rolle spielt. Je stärker dieses ist, desto weniger rasch reagiert bekanntlich eine Flüssigkeit auf Zusatz von Säure oder Base und gerade

iese Eigenschaft eines hohen Pufferungsvermögens zeichnet den Traubensaft beziehungsweise Wein in besonderem Maße aus. Hätte der Traubensaft diese Eigenschaft nicht, dann würde sich die pH -Zahl während der Gärung in bemerkenswerter Weise verschieben, das heißt, der Wein hätte einen anderen pH -Wert als der ursprüngliche Traubensaft. Die Titrationsazidität hat biologisch ein weit geringeres Interesse als die aktuelle Azidität des Weines. Diese bewegt sich um den pH -Wert von etwa 3,0—3,65, einem immerhin bemerkenswerten Säuregrad.

Tabelle I zeigt, daß Weine, die den gleichen pH -Wert haben, ganz verschiedene Werte der Titrationsazidität aufweisen können, worauf schon C. v. D HEIDE [46] hingewiesen hat. Die angeführten Weine stammen aus badischen und elsässischen Anbaugebieten.

Tabelle I. Titrations- und aktuelle Azidität in Weinen.

Sorte u. Jahrgang	Titration Azidität (pot. Azidität)	Aktuelle Azidität (pH -Wert)	Delogarithm. aktuelle Az.
Rappoltsweiler 1935	4,8	3,64	2,3
" 1927	5,5	3,67	2,1
Hattichberg 1940	5,6	3,61	2,6
Egisheimer 1941	5,9	3,38	4,2
Hügelheimer 1940	6,5	3,63	2,2
Reichenweiler 1938	6,5	3,56	2,8
Achkarrener 1941	6,5	3,51	3,1
Freiburger 1941	6,7	3,70	5,0
" 1941	7,0	3,22	6,0
Mühlforster 1941	8,0	3,44	3,6
Freiburger 1941	8,5	3,01	9,8
Fehrenberger 1941	9,0	3,28	5,2
Traubensaft 1938	12,6	3,20	6,3

Die angeführten Zahlenreihen werden besonders anschaulich, wenn wir die pH -Werte, die ja negative Logarithmen darstellen, delogarithmieren und diese Werte neben den Werten der Titrationsazidität graphisch zur Darstellung bringen, wie es Abb. 1 zeigt. Die beiden Kurven zeigen keinerlei Parallelität. TH. PAUL u. A. GÜNTHER [47, 48] haben sogar beobachtet, daß durch die Ausscheidung von Weinstein der Gehalt an titrierbarer Säure wohl vermindert wird, der pH -Wert aber zunimmt. Ich verweise auch auf die diesbezügliche Darstellung bei A. GÜNTHER [37], wo sich noch weitere Literatur findet.

Ich führe diese Feststellungen an, um zu zeigen, daß das im Wein einsetzende übliche Zurückgehen der Titrationsazidität kein Anlaß zum Einsetzen eines Säureabbaues sein muß, dies um so weniger, als ja der Wein auffallend gepuffert ist, vor allem durch seinen Gehalt an organischen Säuren bzw. deren Salze (Äpfelsäure, Weinsäure, Aminosäuren, anorganische Salze). Um das Pufferungsvermögen verschiedener Weine anschaulich darzustellen, habe ich umstehende Tabelle II aufgestellt.

Der Begriff „Pufferungsspanne“, den ich hier einführe, soll das Pufferungsvermögen eines Weines angeben. Je niedriger

der dafür maßgebliche Wert ist, desto höher ist das Pufferungsvermögen des betreffenden Weines.

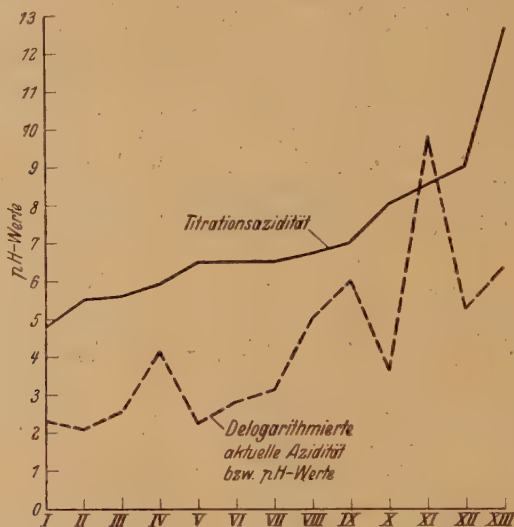


Abb. 1.

Tabelle II. Pufferungsvermögen verschiedener Weine.

									Trauben-saft
10 cem Wein		$p_H = 3,01$	3,16	3,22	3,25	3,30	3,45		3,20
10 cem Wein + 5 cem	Na OH 1000	$p_H = 3,01$	3,16	3,23	3,25	3,30	3,42		3,23
10 cem Wein + 10 cem	Na OH 1000	$p_H = 3,02$	3,18	3,25	3,26	3,31	3,44		3,25
10 cem Wein + 20 cem	Na OH 1000	$p_H = 3,06$	3,23	3,29	3,29	3,34	3,48		3,25
10 cem Wein + 50 cem	Na OH 1000	$p_H = 3,18$	3,34	3,40	3,39	3,42	3,62		3,32
10 cem Wein + 75 cem	Na OH 1000	$p_H = 3,26$	3,43	3,49	3,46	3,47	3,72		3,35
10 cem Wein + 100 cem	Na OH 1000	$p_H = 3,35$	3,53	3,56	3,54	3,54	3,81		3,36
Pufferungsspanne		0,34	0,37	0,34	0,29	0,24	0,36		0,16

Zur Bestimmung der Pufferungsspanne dient eine $\frac{n}{1000}$ -NaOH, die in dieser Konzentration im wesentlichen dem Wein äquivalent ist, der bezüglich seiner Azidität einer $\frac{n}{1000}$ -Säure ungefähr gleichkommt. Zur

Ermittlung dieser Pufferungsspanne werden jeweils 10 ccm des fraglichen Weines verwendet. Obige Tabelle zeigt, daß der unvergorene Traubensaft mit einer Pufferungsspanne von 0,16 ein weit höheres Pufferungsvermögen aufweist als die Weine. Dies ist ohne weiteres begreiflich, verliert doch der Traubensaft während der Gärung durch die *Hefe* eine ganze Reihe von Stoffen, die einer Pufferung dienen können, aber von der *Hefe* resorbiert werden.

Dieses besagte enorme Pufferungsvermögen des Traubensaftes und auch des Weines veranschaulicht folgende Überlegung. Wenn wir 10 ccm des obigen Traubensaftes, der den pH -Wert von 3,20 aufweist,

mit 100 ccm $\frac{n}{1000}$ NaOH versetzen, so erhalten wir ein Gemisch mit dem pH -Wert von 3,36. Hätte der Traubensaft überhaupt kein Pufferungsvermögen, dann würde sich ein pH -Wert von etwa 11,0 eingestellt haben! Ganz analog wäre das Verhalten der verschiedenen Weine.

Es ist also unwahrscheinlich, daß wir durch Bindung eines Teiles der im Wein vorkommenden Säure mittels Zugabe von kohlensaurem Kalk, wie dies zum Zwecke der Entsäuerung empfohlen wird, die aktuelle Azidität vermindern (66 g CaCO_3 /hl Wein bedingen eine Verminderung um 1 ‰ Säure). Wenn wir die diesbezüglichen Angaben von W. SEIFERT [30], C. v. D. HEIDE [46], H. MÜLLER-THURGAU u. A. OSTERWALDER [32] und P. KULISCH [49], die durch eine solche Maßnahme eine Förderung des Säureabbaues beobachtet haben wollen, vergleichen, dann finden wir keinerlei übereinstimmende Ergebnisse. Durch die Zugabe von kohlensaurem Kalk zum Wein wird wohl dessen Titrationsazidität herabgesetzt, aber der pH -Wert, der ja in erster Linie für eine *Bakterienentwicklung* maßgeblich ist, erfährt praktisch keine Verschiebung.

Welche organischen Säuren kommen im Wein überhaupt in nennenswerten Mengen vor? Bei dieser Frage müssen wir den Befund vor und nach der Gärung unterscheiden. Im Traubensaft finden wir, je nach Jahrgang, 2–8 ‰ Weinsäure und 5–20 ‰ und mehr Äpfelsäure, die den Hauptanteil an organischen Säuren ausmachen. Dazu kommt noch etwa 0,03 ‰ Gerbsäure, die in Rotweinen von 1,0 bis zu 2,5 ‰ enthalten ist. Im Wein, bedingt durch die Gärung und den Säureabbau, finden wir etwa 2–6 ‰ Milchsäure, minimale Mengen von Bernsteinsäure, nicht über 1 ‰, und flüchtige Säuren (Essigsäure, Spuren von Buttersäure und Ameisensäure) zusammen 0,4–0,5 ‰, also so wenig, daß sie geschmacklich ohne Bedeutung sein dürften. Der Gehalt an Weinsäure scheidet im Verlauf der Gärung infolge der Alkoholbildung in Form von Weinstein bis auf etwa 1–3, höchstens 5 ‰ aus.

Wenn wir nun die uns vorweg interessierende Frage, welchen Einfluß der Säuregrad, also der pH -Wert, auf den Säureabbau haben mag, aufwerfen, so können wir sagen, daß auch hier, wie bezüglich des Hefetribes, keinerlei konkrete Zusammenhänge bestehen. Gewiß verläuft

ein Säureabbau in sonnigen Jahrgängen erfahrungsgemäß flotter als in weniger guten, vorwiegend sauren Weinen. Wenn wir aber einen sauren Jahrgang, der den pH -Wert um 3,0 aufweisen mag und keinen Säureabbau zeigt, auf einen pH -Wert von etwa 3,6 einstellen, wie er für Weine guter Jahrgänge üblich ist, dann setzt trotz des geringeren Säuregrades dennoch kein Säureabbau ein und umgekehrt würde in einem Wein, der die Voraussetzungen zu einem Säureabbau erfüllt, ein solcher erfolgen, auch wenn wir seinen pH -Wert auf etwa 2,8 einstellen würden. So können wir besonders bei den Moselweinen immer wieder einerseits einen relativ tiefen Säuregrad beobachten, anderseits trotzdem einen meist regen Säureabbau.

Wir können also auch mit dem „Säuregrad“ im Wein als ausschlaggebendem Einflußfaktor für den Säureabbau zu keinem brauchbaren Ergebnis kommen.

Schließlich wird als dritter Faktor die Temperatur erwogen, unter welcher der Wein in den Keller gebracht und hier gelagert wird. Selbstverständlich ist diese, wie für alle biologische Vorgänge, so auch für den Verlauf des Säureabbaues von weitgehender Bedeutung. Wenn der im Keller gelagerte Wein eine Temperatur von nur 6—8° C anzeigt, dann ist das *Bacterium gracile* nicht mehr sehr aktiv, wenn es auch nach Angabe von H. MÜLLER-THURGAU u. A. OSTERWALDER [32] noch bei 3° C eine minimale Lebenstätigkeit äußert. Bei Temperaturen von 13—15—17° C ist, wenn alle sonstigen Voraussetzungen zu einem Säureabbau gegeben sind, ein als normal zu bezeichnender Säureabbau zu erwarten. Hierüber finden wir Angaben bei TH. OMEIS [50, 51], A. HALENKE u. O. KRUG [52] und H. MÜLLER-THURGAU u. A. OSTERWALDER [32].

Aus dem Gesagten geht hervor, daß man durch geeignetes Regulieren der Kellertemperatur beziehungsweise der Temperatur des Weines einen erwünschten Säureabbau beschleunigen, aber auch umgekehrt einen ungern gesehenen Verlust an Äpfelsäure stoppen kann. Hierüber finden wir Angaben bereits bei P. KULISCH [7, 53], K. WINDISCH [54] und A. HALENKE u. O. KRUG [55]. Sind jedoch die notwendigen ernährungsbiologischen Bedingungen zu einem Säureabbau nicht gegeben, dann erfolgt auch bei einer für *Bacterium gracile* optimalen Temperatur von 20—22° kein Säureabbau.

Ein sogenannter „Säuresturz“ kann dann eintreten, wenn einerseits im Herbst bis zum Frühjahr die Kellertemperatur relativ niedrig war, dann aber im Sommer rasch eine bemerkenswerte Temperaturerhöhung und damit ein kräftiger Säureabbau einsetzt, wiederum aber nur dann, wenn die besagten Voraussetzungen erfüllt sind. Auch der Alkoholgehalt kann, worauf ich oben schon hingewiesen habe, auf den Verlauf des Säureabbaues einen Einfluß haben. So haben A. KOCH [23], W. SEIFERT [30], TH. OMEIS [51], A. HALENKE u. O. KRUG [56] und H. MÜLLER-THURGAU u. A. OSTERWALDER [32] beobachtet, daß ein Alkoholgehalt von etwa 10—11 Gewichts-% den Säureabbau unter-

drückt, besonders wenn die übrigen Voraussetzungen für eine Entwicklung des *Bacterium gracile* ungünstig gelagert sind. Wird also ein Wein so stark gezuckert, daß er mindestens 10 Gewichts-% Alkohol entwickelt, dann kann schon aus diesem Grunde ein Säureabbau in Frage gestellt sein. Ist also ein Säureabbau erwünscht, dann dürfen wir eine Zuckering nicht über 85—90° Öchsle beziehungsweise 9% Alkohol betreiben, damit das *Bacterium gracile* keine Entwicklungshemmung erleidet.

Wenn wir das bisher Gesagte vergleichend beurteilen, dann erkennen wir, daß weder der Hefetrub, noch Säuregrad und Temperatur für die Entwicklung des *Bacterium gracile* eine entscheidende Rolle spielen, auch dann nicht, wenn sie optimal gegeben sind. Es müssen also für einen erfolgreichen Säureabbau andere Momente maßgeblich sein.

Für eine Reihe von Mikroben ist bereits erwiesen, daß sie, im Gegensatz zu den grünen Pflanzen, die wirkstoffautogen¹ sind, gewisse akalorische Wirkstoffe, die im Dienst assimilatorischer und dissimilatorischer Umsetzungen stehen, nicht selbst zu bilden vermögen, sondern auf die Zufuhr solcher Stoffe mit der Aufnahme der Nährstoffe angewiesen sind. Zu dieser Gruppe von Mikroben zählen in besonderem Maße die *Milchsäurebakterien*, zu denen im weiteren Sinne auch das *Bacterium gracile* zu rechnen ist, führt es doch Äpfelsäure im Wein in Milchsäure über.

In der Literatur finden wir über diesen Fragenkomplex eine Reihe von Angaben. So bei S. ORLA-JENSEN [57], S. ORLA-JENSEN, N. C. OTTE u. A. LÉOG-KJAER [58], E. E. SNELL, F. M. STRONG u. W. H. PETERSON [59, 60], E. E. SNELL, E. L. TATUM u. W. H. PETERSON [61], E. F. MÖLLER [62, 63], E. F. MÖLLER u. K. SCHWARZ [64], D. D. WOODS [65], R. KUHN u. K. SCHWARZ [66] u. a.

Daß gerade die *Milchsäurebakterien* hinsichtlich ihrer Ernährung vielfach erhebliche Ansprüche stellen, entnehmen wir auch einem Aufsatz von R. KUHN [67], in welchem angeführt ist, daß zum Beispiel für *Streptobacterium plantarum* neben Zucker und Mineralstoffen 11 Aminosäuren und 6 Wirkstoffe (Aneurin, Adermin, Nikotinsäure, Adenin, Biotin und Pantothensäure) notwendig sind.

Nun ist die Bezeichnung „*Milchsäurebakterien*“ in gewissem Sinne ein Sammelbegriff für all jene Bakterien, die sich durch Milchsäurebildung auszeichnen und nur deshalb eine gewisse Analogie verkörpern, doch in ernährungsbiologischer Hinsicht, besonders was Wirkstoffe anlangt, sich mehr oder weniger voneinander unterscheiden. Auch in morphologischer Hinsicht begegnen sie uns in den verschiedensten Formen, kommen sie doch

¹ Den Begriff „autogen“ führe ich hier ein im Gegensatz zu dem Begriff „autotroph“. Dieser sagt aus, daß die Pflanze in der Lage ist, sich ihre Nährstoffe aus anorganischen Stoffen selbst aufzubauen und in analoger Weise soll autogen bedeuten, daß eine Pflanze sich mit Wirkstoffen selbst zu versorgen vermag, im Gegensatz zu einer Reihe von heterotrophen Pflanzen, die auf die Zufuhr von solchen akalorischen Wirkstoffen angewiesen sind, zum Beispiel auf gewisse Vitamine, auf Bioswuchsstoffe u. a. Wir unterscheiden demnach nährstoffautotrophe und -heterotrophe beziehungsweise wirkstoffautogene und -heterogene Individuen.

als Lang- und Kurzstäbchen vor, als Monokokken, Diplokokken, Tetraden, Pediokokken und Sarcinen, alle mit der besagten Fähigkeit, Kohlehydrate und auch organische Säuren in Milchsäure überzuführen. Sie verfügen eben alle offenbar über einen mehr oder weniger übereinstimmenden Enzymhaushalt, was sie allein über alle morphologischen Verschiedenheiten hinweg zu der großen physiologisch charakterisierten Gruppe der *Milchsäurebakterien*, besser ausgedrückt Milchsäure bildenden Bakterien, zusammen-schließt.

ORLA-JENSEN, der die Biologie der Milchsäurebakterien eingehend studiert hat, stellte folgende nach physiologischen Gesichtspunkten differenzierte Zweiteilung auf:

- I. Vorwiegende Bildung von Milchsäure, Nebenprodukte entstehen nur spurenweise: homofermentative Milchsäurebakterien.
- II. Neben der Bildung von Milchsäure entsteht noch eine bemerkenswerte Menge von sonstigen organischen Stoffen: heterofermentative Milchsäurebakterien.

Für beide Gruppen gibt er folgende Kriterien an:

1. Sie müssen Milchsäure bilden.
2. Sie benötigen komplexe Stickstoffverbindungen, und zwar dieselben Aminosäuren-Komplexe, wie sie der tierische Organismus benötigt.
3. Sie müssen grampositiv sein.
4. Sie müssen fakultativ anaerob sein.
5. Sie dürfen keine Katalase besitzen.

Von der besagten Tatsache ausgehend, daß die *Milchsäurebakterien* und damit auch *Bacterium gracile*, in ihrer Entwicklung von gewissen, jeweils charakteristischen Wirkstoffen abhängig sind, führte ich mit *Bacterium gracile* die nachfolgend beschriebenen Versuche durch. Als Nährsubstrat verwendete ich

- I. Einen Wein, in dem noch kein Säureabbau erfolgt war,
- II. Einen Wein, in dem bereits ein Säureabbau erfolgt war,
- III. Einen unvergorenen Traubensaft.

Von diesen drei Substraten füllte ich je 30 ccm in Erlenmeyerkölbchen von 100 ccm, beimpfte sie mit je 3—4 Tropfen einer Suspension von *Bacterium gracile* und stellte sie im Brutschrank bei 17° C auf. Diese Bakterienaufschwemmung stellte ich, um jeglichen Wirkstoffeinfluß von Seiten des Bakteriensubstrates auszuschalten, folgendermaßen her. Zunächst dekanthierte ich von der etwa drei Wochen alten Kultur die überstehende Nährflüssigkeit (Hefewasser) ab und ersetzte diese durch Leitungswasser, schüttelte gut durch, zentrifugierte, goß das überstehende Wasser ab und nahm die Bakterien mit 20 ccm Wasser auf, um diese Suspension dann zum Impfen zu verwenden.

Nach etwa drei Wochen zeigten die Versuchsreihen I und III eine Entwicklung des *Bacterium gracile* an, wogegen in Reihe II keinerlei Wachstum zu beobachten war.

Die gleiche Versuchsanordnung führte ich ein zweites Mal durch, konzentrierte aber die Weine und den Traubensaft, um auf diese Weise eine kräftigere Entwicklung des *Bacterium gracile* zu gewährleisten. Von den Proben I und III dampfte ich je einen Liter bei etwa 60° C auf 500 ccm ein, den Traubensaft, um keine zu hohe Zuckerkonzentration zu erreichen, auf etwa 700 ccm. Wiederum stellte sich in den

Proben I und III, dieses Mal beinahe üppig, ein Wachstum des *Bacterium gracile* ein, besonders in der Reihe I, dagegen zeigte sich, wie erwartet, in Reihe II keinerlei Entwicklung.

Damit war meine Vermutung bestätigt, daß für die Entwicklung des *Bacterium gracile* gewisse Stoffe notwendig sind, welche die Weinbeere nur in mehr oder weniger relativ geringen Mengen enthält, die aber für dessen Entwicklung notwendig sind, das heißt, daß das Maß des Vorhandenseins dieser Wirkstoffe im Wein die Intensität des Säureabbaues bestimmt. Nur so, wenn wir eben die Qualität der Weintrauben kausal mit dem Säureabbau in Zusammenhang bringen, können wir verstehen, daß der Säureabbau im Wein jahrgangsbedingt bald mehr, bald weniger intensiv einsetzt. Tatsächlich zeigt ja die Erfahrung, daß dieser Vorgang in sonnenreichen Jahrgängen am flottesten verläuft. Als wesentlich zeigt sich bei diesem Versuch, daß das *Bacterium gracile* auch im Traubensaft zur Entwicklung gelangt.

Hier erscheint folgende Beobachtung angebracht. Hin und wieder ergibt sich in Weinkellern die Tatsache, daß zwei nebeneinander gelagerte Fässer, die den Wein vom gleichen Lesegut enthalten, trotzdem einen verschieden verlaufenden Säureabbau zeigen. Die Unterschiede können erfahrungsgemäß so konträr sein, daß in dem einen der beiden Fässer ein völlig normaler Säureabbau erfolgt, in dem zweiten Faß dagegen ein solcher kaum oder garnicht einsetzt.

Diese Tatsache findet in folgender Weise eine Erklärung. Bei der Kelterung der Weintrauben können wir Vorlauf, Preßmost und Nachdruck unterscheiden. Der Vorlauf ist trübe und enthält alle leicht abfließenden Inhaltsstoffe der Weinbeeren. Der Nachdruck ist zwar klar, aber stark gepreßt. Daß Vorlauf und Nachdruck in ihrer Zusammensetzung mehr oder weniger voneinander abweichen, ist leicht einzusehen. So sind der Stickstoff-, Aschen- und Wirkstoffgehalt in der kräftig ausgepreßten zweiten Hälfte der Kelterung höher, weshalb auch hier schon die Gärung oft rascher einsetzt als im Vorlauf. In ganz analoger Weise wird auch der Säureabbau in der zweiten Hälfte einer Kelterung günstigere Voraussetzungen für seine Entwicklung finden als in der ersten Hälfte. In all jenen Fällen, bei welchen wohl durch Zufall eine getrennte Füllung einer Kelterung, nämlich eine erste und eine zweite Hälfte, in je ein Faß erfolgt, können wir mit der besagten Erscheinung rechnen, daß in der zweiten Hälfte der Säureabbau einen relativ besseren Verlauf zeigt als in der ersten Hälfte, in der er mitunter ausbleibt.

Diese Erklärung steht übrigens ganz im Einklang mit der Tatsache, auf die schon J. NESSLER hingewiesen hat, daß Weine, die auf den Trestern vergoren sind, ihre Säure stärker abbauen als die übrigen Weine. Daher auch der oft sehr rasch verlaufende Säureabbau in Rotweinen, der schon oft während der Gärung einsetzt, erfolgt doch hier die Vergärung der Weintrauben vor der Kelterung, so daß der gesamte Wirkstoffgehalt der Weinbeeren einschließlich deren Schalen zur Auswirkung gelangt.

Daß eine Trennung von Substraten in einer Flüssigkeit, besonders wenn wir geeignete Filter dazu verwenden, zu biologisch verschiedenwertigen Flüssigkeiten führen kann, konnte ich mit folgendem Experiment zeigen.

Der Pilz *Phycomyces Blakesleeanus* ist bekanntlich Aneurin-heterogen, also auf die Zufuhr von Vitamin B₁ im Nährsubstrat angewiesen. Wenn wir nun einerseits unveränderten Traubensaft als Nährsubstrat verwenden, andererseits einen solchen, der scharf filtriert wurde, dann entwickelt sich in diesem letzteren Substrat der Pilz bedeutend schlechter, weil eben ein beträchtlicher Teil des Aneurins weggefiltert ist.

Zu diesem Versuch ist noch folgendes zu sagen. Im Zusammenhang mit anderen Untersuchungen, bei welchen es sich darum handelte, den Einfluß des pH -Wertes auf die Aneurinwirkung zu beobachten, machte ich [68] die Feststellung, daß die verschiedensten pflanzlichen Extrakte, je nachdem, bei welchem pH -Wert sie filtriert wurden, bald mehr, bald weniger bis gar kein Vitamin B₁ enthalten. So konnte ich mittels *Phycomyces Blakesleeanus* experimentell zeigen, daß genanntes Vitamin beim Filtrieren des Traubensaftes durch ein Seitzfilter im pH -Bereich von 4,5 nicht in das Filtrat übergeht, unterhalb dieses Wertes, also nach der zunehmend sauren Seite hin, das Filter in geringem Maße, dagegen nach dem neutralen pH -Bereich hin zunehmend bis quantitativ passiert. Die ganz analoge Feststellung machte ich [68] mit wäßrigem Extrakt von Johannisbeeren, Stachelbeeren, Kirschen, Birnen, Löwenzahn u. a.

Diese Beobachtung ist für die Süßmostgewinnung von einiger Bedeutung und führt zu der Frage, ob wir dem ästhetischen Moment Rechnung tragen und völlig klaren Traubensaft auf den Markt bringen sollen oder ob wir dem ernährungsbiologischen Faktor eine gebührende Berücksichtigung schenken und weniger klaren, aber biologisch wertvolleren Traubensaft im Handel anbieten².

Wenn wir uns dem Säureabbau wieder zuwenden, so hat nach zahlreichen Angaben, so von H. MÜLLER-THURGAU [17, 69], P. KULISCH [7], A. KOCH [27, 70], R. MEISSNER [71, 72], A. HALENKE u. O. KRUG [55, 56], TH. OMEIS [51] u. a., eine Naßzuckerung vielfach eine Verzögerung des Säureabbaues zur Folge. Nach der soeben gegebenen Erklärung, daß die Entwicklung der säureabbauenden Bakterien von gewissen Wirkstoffen im Wein abhängig ist, können wir diese immer wieder gemachte Beobachtung wohl verstehen. Durch eine Naßzuckerung wird der Wein gestreckt, das heißt, als Substrat mit Zuckerwasser verdünnt. Diese Substrat- bzw. Wirkstoffverdünnung hat wohl die verzögerte Entwicklung der säureabbauenden Bakterien zur Folge.

Natürlich wird durch eine Naßzuckerung auch die Titrationsazidität herabgesetzt, wogegen der pH -Wert, wie A. KAWA [73] zeigte, kaum eine Verschiebung erfährt. Dazu ist der Wein viel zu stark gepuffert, worüber ich oben bereits berichtet habe.

² Das gleiche gilt für die Bereitung von Brotaufstrich aus Obst. Das blanke Gelee hat zwar ein schönes Aussehen, ist aber bezüglich seiner Inhaltsstoffe weit geringwertiger als das Mus, das sämtliche Inhalts- und Ballaststoffe des Ausgangsmaterials in sich birgt.

Welcher Art sind nun jene fraglichen Stoffe, die für eine Entwicklung des *Bacterium gracile* notwendig erscheinen? Zu ihrer Identifizierung können wir zwei Wege beschreiten.

Methodisch einfacher, aber mitunter langwierig, ist das Zusammensetzen einer synthetischen Nährlösung analog der von R. KUHN [67] angegebenen Nährlösung für *Streptobacterium plantarum*. Durch geeignet erscheinende Kombination gewisser Aminosäuren und Wirkstoffe ist es durchaus möglich, den erforderlichen Nähr- und Wirkstoffkomplex auf diesem rein empirischen Wege ausfindig zu machen.

Der zweite, wissenschaftlich exaktere Weg ist die Analyse abbaubereiten Weines, so schwierig sie uns auch methodisch erscheint. Doch dürfte es möglich sein, aus einem geeigneten Wein zum Beispiel mit Hilfe der chromatischen Adsorptionsmethode die gesuchten Wirkfaktoren zu isolieren und dann auch zu identifizieren. Es würde dann keine Schwierigkeiten mehr bereiten, einen Säureabbau nach Wunsch zu aktivieren.

Weit schwieriger wäre es wohl, dann auch umgekehrt einen Stoff ausfindig zu machen, gewissermaßen einen Antikörper, der als Antagonist einer unerwünschten Entwicklung des *Bacterium gracile* entgegenzuwirken vermag, wie es zum Beispiel bei einer Reihe von pathogenen Kokken, die auf Vitamin H' (p-Aminobenzoesäure) angewiesen sind, mittels Sulfonamiden gelungen ist. Wenn wir erreichen könnten, nur einen einzigen der für *Bacterium gracile* notwendigen Wirkstoffe zu inaktivieren, dann könnte ein Säureabbau jederzeit nach Belieben abgestellt werden. Ich verweise in diesem Zusammenhang auf die Darstellung von K. WALLENFELS [74], in welcher das Prinzip eines solchen Eingriffes abgehandelt wird.

Soviel über meine Ergebnisse, daß die für den biologischen Säureabbau im Wein erforderlichen Bakterien, im besonderen *Bacterium gracile*, zu ihrer Entwicklung gewisse akalorische Wirkstoffe benötigen, die in den Weinbeeren, abhängig vom Jahrgang in bald mehr, bald weniger reichem Maße gebildet werden.

Nachfolgend sollen einige Überlegungen, Beobachtungen und Experimente zur Darstellung kommen, die geeignet erscheinen, das Problem der Wirkstoffe bzw. Wirkfaktoren und damit die Biologie des Säureabbaues noch näher zu beleuchten. Nicht, daß es sich um Einflußfaktoren handeln sollte, die eine grundsätzliche Bedeutung für die Entwicklung des *Bacterium gracile* hätten. Diese hängt allein von den vorstehend besagten Wirkstoffen der Weinbeere ab. Es handelt sich vielmehr um solche Agenzien und Eigenschaften des Nährsubstrates, die den spezifischen Stoffeffekt eventuell zu katalysieren bzw. aktivieren vermögen.

Ich möchte zunächst auf eine Einflußmöglichkeit hinweisen, die erst im Laufe der vergangenen 10 Jahre im Gärungsgewerbe an Bedeutung gewonnen hat, nämlich das Redoxpotential. Ich komme um so mehr auf diesen Fragenkomplex zu sprechen, als für die Festlegung eines Redoxpotentials in einer Nährlösung gerade solche Faktoren in besonderem Maße mitspielen, die wir ernährungsbiologisch schlechthin als Wirkstoffe betrachten, so Vitamine, Enzyme, Aminosäuren, Spurenelemente u. a., die von Fall zu Fall den rH -Wert erhöhen oder erniedrigen können, so daß mit der Gegenwart gewisser Wirkstoffe auch ein bestimmter rH -Bereich gewährleistet ist. Ein geeignetes Beispiel solcher substratbedingter Labilität ist

Hefe. Unter anaeroben Lebensbedingungen, also bei dem relativ niedrigen r_H -Wert von etwa 11—12, vergärt sie Zucker zu Alkohol und Kohlensäure. Belüften wir das Nährsubstrat, so daß wir einen Wert von etwa $r_H = 25$ und mehr haben, dann veratmet die *Hefe* den Zucker zu Kohlensäure und Wasser, sie lebt aerob. Im ersteren Falle werden 26 Kalorien frei, im zweiten Falle 675 Kalorien. Es ist offensichtlich, daß die Bilanz dieser Lebenshaltung für die *Hefe* bei weitem günstiger ausfällt. Tatsächlich vermehrt sich die *Hefe* um das 3—4fache stärker als im Falle der Gärung, der ökonomische Koeffizient ist unter aeroben Lebensbedingungen um ein Mehrfaches höher. Auf Grund dieser Tatsache können wir Gärstockungen durch Belüften des Weines, das heißt durch Erhöhen des r_H -Wertes, beheben.

Es liegt nahe, daran zu denken, daß diese Verhältnisse für den Stoffwechsel des *Bacterium gracile* in ganz analoger Weise Gültigkeit haben. Dieses Bakterium ist, wie die *Hefe*, fakultativ anaerob, vermag also mit und ohne Sauerstoff der Luft seinen Lebensunterhalt zu bestreiten. Seine Energiequelle ist jedoch nicht der Zucker, wenigstens in seiner Rolle als säureabbauendes Bakterium, sondern die im Wein vorhandene Äpfelsäure. Diese wird nach der bisher gegebenen Darstellung gemäß der eingangs gegebenen Gleichung in Milchsäure und Kohlensäure umgesetzt.

Es erscheint notwendig, hier einiges über die Biochemie des Säureabbaues auszuführen. Wie gesagt, ist die Äpfelsäure des Weines für *Bacterium gracile* ein Nährstoff, der als Kohlenstoffquelle die gleiche Rolle spielt, wie zum Beispiel der Zucker für die *Hefe*. Der Abbau der Äpfelsäure, wie ihn die obige Gleichung darstellt, kann aus rein biologischen Überlegungen in dieser Weise nicht erschöpfend dargestellt sein; denn die Milchsäure mit 326 Kalorien ist ja kalorienreicher als die Äpfelsäure, die nur 320 Kalorien verkörpert, aber die Ausgangsquelle für die Milchsäure darstellt. Die Überführung der Äpfelsäure in Milchsäure bedeutet also für *Bacterium gracile* nicht nur keinerlei Kaloriengewinn, es handelt sich vielmehr um einen endothermen Vorgang, bei dem also Energie bzw. Kalorien noch zusätzlich verbraucht werden. Woher nimmt das *Bacterium gracile* die hierzu notwendigen Kalorien?

Die von H. SCHANDERL [42] gegebene Erklärung, daß diese Kalorien von Eiweißstoffen herrühren, ist unwahrscheinlich, abgesehen davon, daß der Säureabbau ja dann als ein Fäulnisprozeß, nicht aber als Gärung zu bezeichnen wäre³. Der tatsächliche Verlauf dieses zunächst merkwürdig erscheinenden Vorganges findet auf Grund einer anderen Überlegung eine plausible Erklärung.

Die Tatsache, daß ein bakterieller Umsatz von organischen Stoffen nicht rein exotherm verläuft, also unter Freiwerden von Kalorien,

³ Wir unterscheiden bekanntlich:

Abbau N-freier	}	aerob = Atmung
org. Verbindungen		anaerob = Gärung
Abbau N-haltiger	}	aerob = Verwesung
org. Verbindungen		anaerob = Fäulnis

sondern zu einem gewissen Teil auch endothermer Natur ist, also Kalorien verbrauchend, begegnet uns bei einer ganzen Reihe von mikrobiologischen Umsetzungen. Doch stehen alle diese biologischen Vorgänge, bei welchen Kohlehydrate oder organische Säuren abgebaut werden, in ihrer Endbilanz im Dienst einer desmolytisch ausgelösten Wärme bzw. Energiegewinnung. Im Endeffekt gesehen zeigen also diese Umsetzungen doch einen exothermen Verlauf, was ja schließlich der Sinn eines solchen Stoffwechselgeschehens ist.

Die Entstehung der Milchsäure im Rahmen des hier zu erörternden biologischen Geschehens ist also ein mit einem totalen Abbau der Äpfelsäure gekoppelter Vorgang, eine Oxydoreduktion (Dismutation). Solche Korrelationen begegnen uns grundsätzlich bei assimilatorischen und dissimilatorischen Vorgängen. In vorliegendem Falle geht die Bildung der Milchsäure und Kohlensäure aus Äpfelsäure (Hydrierung bzw. Reduktion) kalorisch auf Kosten des Abbaues eines Teiles der Äpfelsäure bis zu Kohlensäure und Wasser (Dehydrierung bzw. Oxydation). Auf diese Weise vermag das *Bacterium gracile* aus der Äpfelsäure, die ihm im Wein als Kohlenstoffquelle zur Verfügung steht, die zur Bestreitung seines Stoffwechsels notwendigen Kalorien zu gewinnen.

Die Bezeichnung „Säureabbau“ kann sich also nicht so sehr, wie das üblich ist, auf die oben stöchiometrisch wiedergegebene endotherme Umsetzung von Äpfelsäure in Milchsäure und Kohlensäure beziehen, als vielmehr auf den exothermen Abbau der Äpfelsäure bis zu Kohlensäure und Wasser.

Gemäß den obigen Ausführungen können wir annehmen, daß wir es beim Zuckerabbau durch die *Hefe* im Wein wohl immer mit zwei, wenn auch quantitativ sehr verschieden verlaufenden Vorgängen zu tun haben, das heißt, die alkoholische Gärung ist, besonders im Anfangsstadium, wenn noch genügend Luft zugegen ist, immer bis zu einem gewissen, wenn auch geringen Grade, mit dem Atmungsprozeß gekoppelt. Aus analogen Gründen können wir auch für *Bacterium gracile* die Schlußfolgerung ziehen, daß sich sein Stoffwechsel unter anaeroben Bedingungen in der endothermen Phase der Milchsäurebildung erschöpft, hingegen einen angemessenen Verlauf erfährt, sobald genug freier Sauerstoff für eine Überleitung in die exotherme bzw. aerobe Phase zugegen ist. Dies können wir erreichen, wenn wir den Wein umrühren bzw. umfüllen. Durch das damit bedingte Belüften des Weines erreichen wir eine Speicherung von Luft im Wein bzw. eine Erhöhung seines Redoxpotentials, was einer gegebenen Entwicklungsmöglichkeit des *Bacterium gracile* nur förderlich sein kann.

Wie schon ausgeführt wurde, ist mit dieser r_H -Verschiebung im Nährmedium auch eine Verschiebung im Stoffwechsel des *Bacterium gracile* zwangsläufig gekoppelt, das heißt, daß die Frage des Äpfelsäureabbaues bis zu Kohlensäure und Wasser bzw. deren Überführung in Milchsäure und Kohlensäure eine Variable des jeweiligen r_H -Wertes ist.

Daß das Maß der Milchsäurebildung variabel ist, können wir schon aus der Tatsache entnehmen, daß praktisch weniger Milchsäure gebildet wird, als theoretisch zu erwarten wäre. So geben C. v. D. HEIDE u. N. BARAGIOLA [75] schon an, daß beim Säureabbau aus 1,0 Gramm Äpfelsäure an Stelle der zu erwartenden 0,67 Gramm Milchsäure nur bis zu 0,5 Gramm entstehen. Wir haben Grund zu der Annahme, daß bei ausreichender Belüftung des Weines, also einer Steigerung des rH -Wertes während des Säureabbaues zugunsten einer weitgehenden exothermen Veratmung der Äpfelsäure bis zu Kohlensäure und Wasser, noch weniger Milchsäure frei würde.

Es mag in diesem Zusammenhang erwähnt werden, daß nach Angaben von N. S. SÖHNGEN [76, 77] eine Anreicherung von Sauerstoff an die Grenzflächen suspendierter Kolloide für eine bessere Entwicklung von Mikroben von Bedeutung sein kann. Damit im Einklang steht die Beobachtung von A. BONAZZI, daß durch das Umrühren einer Nährflüssigkeit, das heißt Anreicherung mit Luft bzw. Sauerstoff, das Wachstum von Mikroorganismen begünstigt werden kann.

Schließlich möchte ich noch anfügen, daß die üblichen Behandlungsverfahren des Weines im Keller, z. B. mittels schwefliger Säure, mit gelbem Blutlaugensalz (Ferrocyanalkali), Gelatine und Holzkohle (Eponit), die alle als Reduktionsmittel wirksam sind, also den rH -Wert herabsetzen, schon deshalb die Entwicklung des *Bacterium gracile* hemmen können. Ich verweise auf eine diesbezügliche Arbeit von R. MEISSNER [72], in der angegeben wird, daß durch Blauschönung des Weines, die ja mittels Ferrocyanalkali durchgeführt wird, der Säureabbau eine Verzögerung erfährt, bis eben die verschiedenen Schönungsmittel inaktiviert bzw. wieder ausgeschieden sind. Die Mitteilung von E. KIELHÖFER [39], daß durch Behandlung fröstgeschädigter Moste mit Gelatine, Kohle oder Ferrocyanalkali der Säureabbau eine Förderung erfahre, angeblich durch Verringerung des Gerbstoffgehaltes im Wein, steht damit in Widerspruch.

Daß der rH -Wert im Laufe der Lagerzeit des Weines wohl eine Steigerung erfährt, deutet auch die Tatsache an, daß die jungen Weine meist hellfarbig sind, aber im Laufe der Zeit langsam dunkler, das heißt gelb bis goldgelb werden können. Bei den Farbstoffen im Wein handelt es sich offenbar um solche, die, wenn der rH -Wert niedrig genug ist, in Leukofarbstoffe übergehen. Sobald der Wein, besonders durch Luftberührung, eine Steigerung seines rH -Wertes erfährt, nimmt er auch eine betontere Färbung an. Diese kann bei gesteigerter Luftberührung bis zum sogenannten Braunwerden des Weines führen. Dieser Weinefehler kann durch entsprechende rH -erniedrigende Maßnahmen, zum Beispiel Schwefelung, behoben werden.

Ich komme nun nochmals auf den sogenannten „Hefetrub“ zu sprechen. Wie ich zu Anfang meiner Darstellung schon ausgeführt habe, können wir diesem schlechthin keinen Einfluß auf die Entwicklung des *Bacterium gracile* zuschreiben. Wir können aber auch die zahlreichen Hinweise in der Literatur über einen angeblich fördernden Einfluß nicht ohne weiteres übergehen, müssen uns vielmehr mit dieser umstrittenen Frage bzw. mit der Biologie der *Hefe* etwas befassen.

Es ist bekannt, daß die *Hefe* gegenüber biologisch irgendwie aktiven Stoffen, seien es Vitamine, Wuchsstoffe, Spurenelemente oder sonstige Biokatalysatoren, ein großes Resorptionsvermögen zeigt. Ein Beispiel ist die Bierwürze bzw. das Bier. Die erstere ist von der gekeimten Gerste her ungeheuer reich an Vitamin B₁. Obwohl nun die *Hefe* nicht auf die Zufuhr so großer Mengen von Aneurin angewiesen ist, nimmt sie den gesamten B₁-Gehalt aus der Würze in ihren Zellraum auf, so daß im Bier, das von Haus aus sehr B₁-reich sein könnte, kaum noch nennenswerte Mengen dieses Vitamins enthalten sind. Ich habe an anderer Stelle [68] darüber berichtet.

In ganz gleicher Weise resorbiert und speichert die *Hefe* auch Spuren gewisser Elemente, so zum Beispiel Arsen, Kupfer, Selen u. a. Gerade diese Eigenschaft, das für den Menschen sehr giftige Selen zu speichern, ist von gewisser Bedeutung. Es erscheint nämlich nicht unbedenklich, aus Sulfitablauge, die bei der Papierfabrikation mit einigen Prozent Kohlehydraten als Abwasser anfällt, *Nähr-* bzw. *Futterhefe* zu gewinnen, denn dieses Abwasser ist in der Regel von der schwefligen Säure her selenhaltig und dann die daraus gewonnene *Hefe* in erheblichem Maße gesundheitsschädlich.

Warum soll die Weinhefe aus ganz analogen Gründen während der Gärung, also der Zeit ihrer starken Vermehrung, nicht auch jene im Traubensaft enthaltenen, für *Bacterium gracile* lebensnotwendigen Wirkstoffe resorbieren, so daß in wirkstoffarmen Jahrgängen die wenigen der fraglichen Wirkstoffe in den Hefezellen gespeichert werden und der Säureabbau ausbleibt, und zwar so lange, bis die am Boden des Weinfasses abgelagerte *Hefe* autolytisch zerfällt und damit die fraglichen Nährfaktoren wieder an den Wein abgibt, besonders bei dem sogenannten Aufrühren des Hefetrubes.

Anders in abbaufreudigen, wirkstoffreichen Jahrgängen. Diese enthalten so reichlich die für *Bacterium gracile* notwendigen Wirkstoffe, daß genug davon im Wein verbleiben, um den Säureabbau zu gewährleisten.

Im Sinne dieser Darstellung liegt auch die Beobachtung, die CH. SCHÄTZLEIN [78] schon 1913 beschrieben hat. Er hatte zwei Weinberge, eines, das einen flotten Säureabbau zeigte, ein zweites, bei dem alle Anzeichen eines solchen ausblieben. Nun setzte er diesem zweiten Fasse Hefetrub zu, den er dem ersteren Fasse entnommen hatte und erreichte damit, daß auch in diesem zweiten Wein ein Säureabbau einsetzte.

Es ist nun sehr bezeichnend, daß es P. KULISCH [79] nicht gelungen ist, in einem Wein, der keinen Säureabbau zeigte, einen solchen auszulösen durch Beimpfen mit einem abbaufreudigen Wein. Damit ist bewiesen, daß das Beimpfen eines Weines mit *Bacterium gracile* eben noch nicht ausreicht, um einen Säureabbau einzuleiten, es müssen auch die notwendigen Wirkstoffe zugegen sein, was offenbar dann der Fall ist, wenn ein wirkstoffreicher Hefetrub dem Wein zugesetzt wird. Da-

gegen bleibt jegliche Entwicklung des *Bacterium gracile* aus, wenn wir einen säureabbaubedürftigen Wein mit einem Hefetrub versetzen, der von einem Wein rührt, der selbst keinen Säureabbau zeigt.

Zusammenfassung.

1. Das Maß des biologischen Säureabbaues im Wein hängt von der Qualität der Weintrauben bzw. von der Güte des „Jahrganges“ ab. Je reicher dieser an für *Bacterium gracile* lebenswichtigen Wirkstoffen (Biokatalysatoren) ist, desto kräftiger erfolgt ein Abbau von Äpfelsäure im Wein.
2. Der Abbau der Äpfelsäure durch *Bacterium gracile* ist als Oxydoreduktion aufzufassen, die je nach Milieubedingungen mehr oder weniger anaerob oder aerob verläuft. Allein mittels der aeroben Phase, die biochemisch als Atmungsprozeß zu respektieren ist, bestreitet das *Bacterium gracile* seinen Kalorienhaushalt, während die Bildung der Milchsäure aus der Äpfelsäure in ihrem anaeroben Verlauf endothermen Charakter zeigt.
3. Das Pufferungsvermögen des Weines ist sehr groß, es sei mit dem Begriff „Pufferungsspanne“ ausgedrückt. Je höher das Pufferungsvermögen ist, desto niedriger ist die Pufferungsspanne. Sie ist beim Wein etwa doppelt so groß wie beim Traubensaft. Wir können daraus schließen, daß während der Gärung bzw. durch den Hefestoffwechsel ein beträchtlicher Teil puffernder Bestandteile, anorganische wie organische, resorbiert wird. Desgleichen werden vermutlich von der Hefe die für *Bacterium gracile* lebensnotwendigen Wirkstoffe ganz oder teilweise resorbiert, weshalb der Säureabbau mitunter erst nach dem Autolysieren der Weinhefe einsetzt. Ist dagegen der Jahrgang als solcher an für *Bacterium gracile* notwendigen Wirkstoffen arm, dann bleibt auch das Aufrühren des sogenannten Hefetrubes für den Säureabbau belanglos.

Literatur.

- [1] N. BOUSSINGAULT, *Agronomie, Chimie agricole et Physiologie* 4, 229 (1868). — [2] L. PASTEUR, *Etudes sur le vin*. Paris 1866. — [3] P. KULISCH, Bericht der Lehranstalt Geisenheim 1888/89. — [4] P. KULISCH, Weinbau und Weinhandel 7, 460 (1889). — [5] P. KULISCH, *Landwirtschaftl. Jahrb.* 19, 83 (1890). — [6] P. KULISCH, Weinbau u. Weinhandel 9, 459 (1891). — [7] P. KULISCH, Weinbau u. Weinhandel 15, 422 (1897). — [8] J. WORTMANN, *Landw. Jahrb.* 21, 901 (1892). — [9] J. WORTMANN, *Landw. Jahrbuch* 23, 535 (1894). — [10] J. WORTMANN, *Landw. Jahrbuch* 23, 584 (1894). — [11] J. WORTMANN, Weinbau u. Weinhandel 13, 203 (1895). — [12] J. WORTMANN, *Zentralbl. f. Bakt. II.* 3, 96 (1897). — [13] J. SCHUKOW, *Zentralbl. f. Bakt. II.* 2, 601 (1896). — [14] J. SCHUKOW, Ber. d. Lehranstalt Geisenheim 1897. — [15] C. AMTHOR, *Zeitschr. f. Angew. Chemie* 2, 5 (1889). — [16] H. MÜLLER-THURGAU, Deutscher Weinbau-Kongreß Neustadt a. d. H. 1895. — [17] H. MÜLLER-THURGAU, Deutscher Weinbau-Kongreß Worms 1891. — [18] P.

- KULISCH, Landw. Jahrb. **19**, 83 (1890). — [19] W. SEIFERT, Mitteil. des Deutschen Weinbauvereins **3**, 243 (1908). — [20] H. MÜLLER-THURGAU u. A. OSTERWALDER, Ber. d. Schweiz. Vers.-Anstalt f. Obst- u. Gartenbau 1909. — [21] H. MÜTLER-THURGAU u. A. OSTERWALDER, Ber. d. Schweiz. Vers.-Anstalt f. Obst- u. Gartenbau 1910. — [22] H. MÜLLER-THURGAU u. A. OSTERWALDER, Landw. Jahrb. d. Schweiz 1912, S. 335 u. 347. — [23] A. KOCH, Weinbaukongreß Freiburg i. Br. 1897. — [24] A. KOCH, Weinbau u. Weinhandel **16**, 236 (1898). — [25] A. KOCH, Weinbau u. Weinhandel **16**, 243 (1898). — [26] A. KOCH, Weinbau u. Weinhandel **18**, 395 (1900). — [27] A. KOCH, Weinbaukongreß Kolmar i. E. 1900. — [28] W. SEIFERT, Mitteil. aus dem gärungsphysiol. Labor. Klosterneuburg 1901. — [29] W. SEIFERT, Zeitschr. f. Landw. Vers. Österr. **4**, 980 (1901). — [30] W. SEIFERT, Zeitschr. f. Landw. Vers. Österr. **6**, 567 (1903). — [31] H. MÜLLER-THURGAU u. A. OSTERWALDER, Ztbl. f. Bakt. II, **20**, 463 (1908). — [32] H. MÜLLER-THURGAU u. A. OSTERWALDER, Ztbl. f. Bakt. II, **36**, 129 (1913). — [33] H. MÜLLER-THURGAU u. A. OSTERWALDER, Ztbl. f. Bakt. II, **48**, 1 (1917). — [34] R. KUNZ, Ztschr. f. Untersuch. d. Nahrungs- u. Genußmittel **4**, 673 (1901). — [35] W. MÖSLINGER, Ztschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußmittel **4**, 1120 (1901). — [36] A. v. BABO u. E. MACH, Handbuch der Kellerwirtschaft. Berlin 1921. — [37] A. GÜNTHER, Der Wein. Lpz. 1918. — [38] F. SCHMITTHENNER u. C. v. D. HEIDE, Der Wein. Brschw. 1922. — [39] E. KIELHÖFER, Moderne Kellertechnik. Stuttg. 1942. — [40] H. SCHANDERL, Die mikrobiologischen Grundlagen der Weinbereitung und Früchteverwertung. Stuttg. 1936. — [41] K. HENNIG u. P. OHSKE, Vorratspflege u. Lebensmittelforschung **5**, 408 (1942). — [42] H. SCHANDERL, Deutsche Weinzeitung **80**, Nr. 43/46 (1943). — [43] K. RIPPEL, Ber. d. Deutsch. Bot. Ges. **60**, (108) (1942). — [44] K. RIPPEL, Der deutsche Weinbau **22**, 51 (1943). — [45] K. RIPPEL, Deutsche Weinzeitung **79**, Nr. 101/102 (1942). — [46] C. v. D. HEIDE, Arb. a. d. Kais. Ges. Amt **39**, 23 (1911). — [47] Th. PAUL u. A. GÜNTHER, Arb. a. d. Kais. Ges. Amt **23**, 189 (1905). — [48] Th. PAUL u. A. GÜNTHER, Arb. a. d. Kais. Ges. Amt **29**, 218 (1908). — [49] P. KULISCH, Ztschr. d. Untersuch. v. Nahr. u. Genußmittel **28**, 500 (1914). — [50] Th. OMEIS, Arb. a. d. Kais. Ges. Amt **35**, 400 (1910). — [51] Th. OMEIS, Arb. a. d. Kais. Ges. Amt **39**, 444 (1911). — [52] A. HALENKE u. O. KRUG, Arb. a. d. Kais. Ges. Amt **42**, 612 (1912). — [53] P. KULISCH, Weinbau u. Weinhandel **17**, 12 (1899). — [54] K. WINDISCH, Werden des Weines. Stuttg. 1906. — [55] A. HALENKE u. O. KRUG, Arb. a. d. Kais. Ges. Amt **35**, 428 (1910). — [56] A. HALENKE u. O. KRUG, Arb. a. d. Kais. Ges. Amt **39**, 469 (1911). — [57] S. ORLA-JENSEN, Kgl. danske Vidensk. Selsk., nat. math. Afdel **8**, V, 2 (1919). — [58] S. ORLA-JENSEN, N. C. OTTE u. A. LEOP-KJAER, Ztbl. f. Bakt. II, **94**, 434 (1936). — [59] E. E. SNELL, F. M. STRONG u. W. H. PETERSON, Biochem. Journ. **31**, 1789 (1937). — [60] E. E. SNELL, F. M. STRONG u. W. H. PETERSON, Journ. Amer. Chem. Soc. **60**, 2825 (1938). — [61] E. E. SNELL, E. L. TATUM u. W. H. PETERSON, Journ. Bact. **33**, 207 (1937). — [62] E. F. MÖLLER, Ztschr. f. physiol. Chemie **254**, 285 (1938). — [63] E. F. MÖLLER, Ztschr. f. physiol. Chemie **260**, 246 (1939). — [64] E. F. MÖLLER u. K. SCHWARZ, Ber. d. Deutsch. Chem. Ges. **74**, 1612 (1941). — [65] D. D. WOODS, Brit. Journ. exp. Pathol. **21**, 74 (1940).

- [66] R. KUHN u. K. SCHWARZ, Ber. d. Deutsch. Chem. Ges. **74**, 1617 (1941). — [67] R. KUHN, Die Chemie (Angew. Chemie N. F.) **55**, 1 (1942). — [68] K. RIPPEL, Jahresber. d. Bad. Weinbau-Institutes. Freiburg i. Br. 1940. — [69] H. MÜLLER-THURGAU, Weinbau und Weinhandel **9**, 426 (1891). — [70] A. KOCH, Deutscher Weinbau-Kongreß Neustadt a. d. H. 1895. — [71] R. MEISSNER, Des Küfers Weinbuch. Stuttg. 1909. — [72] R. MEISSNER, Wein und Rebe **3**, 64 (1921). — [73] A. KAWÉ, Deutsche Weinzeitung **1939**, S. 49 u. 155. — [74] K. WALLENFELS, Die Chemie (Angew. Chemie N. F.) **58**, 1 (1945). — [75] C. v. D. HEIDE u. N. BARAGIOLA. Arb. a. d. Kais. Ges. Amt **42**, 12 (1912). — [76] N. S. SÖHNGEN, Ztbl. f. Bakt. II, **37**, 545 (1913). — [77] N. S. SÖHNGEN, Ztbl. f. Bakt. II, **38**, 621 (1913). — [78] Ch. SCHÄTZLEIN, Mitteil. des Deutschen Weinbau-Vereins **8**, 311 (1913). — [79] P. KULISCH, Mitteil. des Deutschen Weinbau-Verbandes **5**, 173 (1910).
-

(Aus den Botanischen Anstalten in Göttingen.)

Notiz über die Wirkung intermittierenden Lichtes auf das Wachstum der Diatomeen.

Von

HERTA BEHREND.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 15. Mai 1948.)

Kultiviert man gewisse Grünalgen (*Chlamydomonas pseudococcus*, *Scenedesmus obliquus*, *Hormidium nitens*, *Stichococcus bacillaris*) in intermittierendem Licht, so hängt ihre Vermehrungsintensität stark von der Länge der Intervalle ab (IGGENA, 1938).

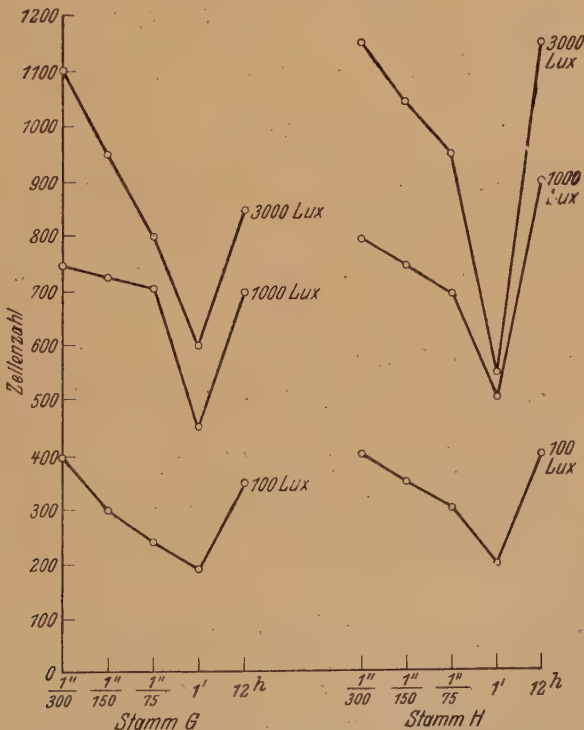


Abb. 1. Zellenzahl nach 14 Tagen bei verschiedenen Hell-Dunkel-Intervallen und verschiedener Lichtintensität.

Bei Anwendung von Licht-Dunkelintervallen von 5:5 Sekunden bis zu 12:12 Stunden fand die schlechteste Entwicklung bei einem Licht-

Dunkelwechsel von 1:1 Minute statt. Mit Verkürzung wie Verlängerung der Zeiten stieg die Entwicklung an und bei 5:5 Sekunden war sie etwa ebenso stark wie bei 12:12 Stunden. GERTRAUD RÖSEL (1943) hat dann derartige Versuche auch noch mit *Chlorella* durchgeführt unter Ausdehnung der Kurzzeiten bis auf $\frac{1}{300}$ Sekunde. Dabei fand noch ein weiterer Anstieg der Vermehrungsintensität gegen die ganz kurzen Intervalle statt (Optimum für *Chlorella vulgaris* bei $\frac{1}{75}$ Sekunde, für *Chlorella pyrenoidosa* bei $\frac{1}{300}$ Sekunde).

Nachstehend wird über einige Versuche berichtet, in denen untersucht wird, ob eine derartige Abhängigkeit der Entwicklung von der

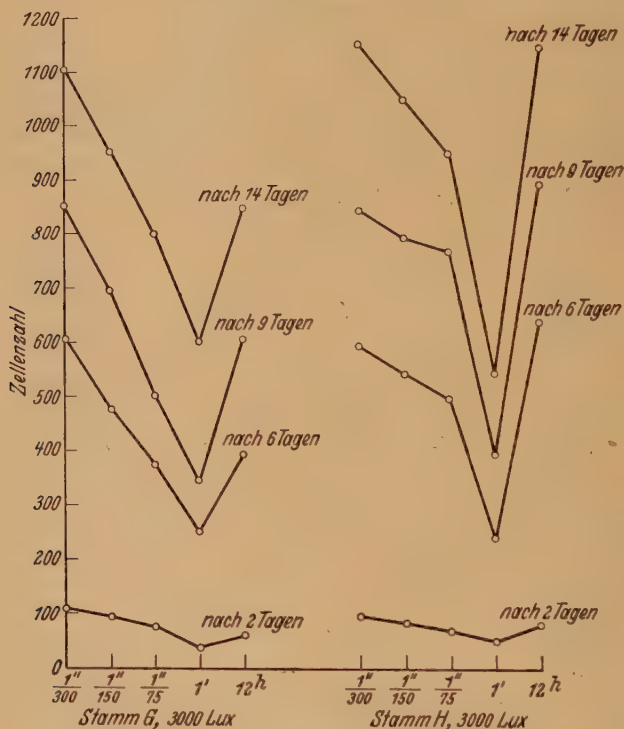


Abb. 2: Zellenzahl bei verschiedenen Hell-Dunkel-Intervallen und 3000 Lux nach 2–14 Versuchstagen.

Intervalllänge auch für *Diatomeen* zutrifft. Die Versuche wurden mit 5 Licht-Dunkelrhythmen gemacht, nämlich 12 Stunden, 1 Minute, $\frac{1}{75}$ Sekunde, $\frac{1}{150}$ Sekunde und $\frac{1}{300}$ Sekunde. Die kurzen Intervalle wurden durch rotierende Scheiben erzeugt. Die Algen (Reinkulturen von zwei nicht bestimmten pennaten Süßwasserdiatomeen) wurden auf Agarplatten in Petrischalen kultiviert, auf die das Licht (3000 Lux, 2000 Lux und 100 Lux) senkrecht von oben fiel. Die Platten wurden durch Übergießen mit einer sehr verdünnten Algenaufschwemmung sehr locker und gleichmäßig beimpft; der Zuwachs wurde während 24 Tagen durch täg-

liches Auszählen der Individuenzahl in einem bestimmten Feld mittels eines Netzkulars bestimmt.

Das Ergebnis ist in Abb. 1 und 2 wiedergegeben. Auf der Abszisse sind die Licht-Dunkelintervalle, auf der Ordinate die Zellenzahl im Einheitsfeld abgetragen. Das Minimum der Vermehrung lag für beide Stämme und bei allen 3 Lichtintensitäten bei dem Licht-Dunkelintervall 1:1 Minute. Die Verkürzung der Lichtblitze auf $\frac{1}{300}$ (also auf das 18000fache) führte innerhalb 14 Tagen etwa zu einer Verdoppelung des Zuwachses, seine Verlängerung auf 12 Stunden (also auf das 720fache) bei Stamm *H* zu etwa den gleichen, bei Stamm *G* zu etwas geringeren Werten (Abb. 1). Dieses Verhältnis war auch an allen vorausgehenden Meßtagen vorhanden, wofür Abb. 2 einige Beispiele bei 3000 Lux gibt.

Das Ergebnis deckt sich mit denen IGGENAS und RÖSELS. Sowohl für die Praxis der Massenkultur von *Algen* wie auch in theoretischer Hinsicht (vgl. WARBURG 1919, 1920) wäre es natürlich von Bedeutung, zu wissen, ob bei einer weiteren Verkürzung der Licht-Dunkelintervalle noch eine weitere Steigerung der Ernte möglich ist. Jedenfalls zeigt aber unser kleiner Versuch schon, daß die *braunen Diatomeen* in intermittierender Beleuchtung den gleichen Gesetzmäßigkeiten unterworfen sind wie die *Chlorophyceen*.

Zusammenfassung.

Diatomeenkulturen zeigen bei Behandlung mit intermittierendem Licht (gleiche Länge des Hell- und Dunkelintervalls) ein ausgesprochenes Zuwachsmimum bei einem Wechsel von 1:1 Minute. Bei Verlängerung des Intervalls auf 12 Stunden wie bei Verkürzung auf $\frac{1}{300}$ Sekunde nimmt die Entwicklung auf etwa das Doppelte zu.

Literatur.

IGGENA, Marie-Luise, Beobachtungen über die Wirkung des Lichtes auf das Wachstum von Blaualgen und Grünalgen. Arch. f. Mikrobiol. 9, 129 (1938).

RÖSEL, Gertraud, Beitr. z. Laboratoriumsmethodik der Algenreinkultur. Diss. Prag 1943.

WARBURG, Otto, Über die Geschwindigkeit der photochemischen Kohlen-säurezersetzung in lebenden Zellen I und II, Biochem. Ztschr. 100, 230 (1919); 103, 188 (1920).

(Aus dem Botanischen Institut der Landwirtschaftlichen
Hochschule Hohenheim.)

Zur Methodik der Beweglichkeitsprüfung von Mikroorganismen.

Von

ERWIN BURCIK.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 27. Juli 1948.)

In der Mikrobiologie, einschließlich der medizinischen Bakteriologie, sind vorwiegend drei Verfahren zur Feststellung der Eigenbeweglichkeit von Mikroorganismen im Gebrauch: Der sogenannte „hängende Tropfen“, die Züchtung in schwachprozentigem Agar (OLDECOP-Nährboden) und die Dunkelfelduntersuchung.

Für letztere sind seit langem besondere Trocken- (Präparier-) Dunkelfeldkondensoren im Gebrauch, doch steht ihrer allgemeinen Verwendung vielfach das Fehlen geeigneter Geräte im Wege. Vor allem wird bei Kursen usw. wohl kaum eine genügende Anzahl der benötigten Spezialkondensoren vorhanden sein. Die den Mikroskopen mitunter beigegebenen Sternblenden zum Einlegen in den Diaphragmenträger des Beleuchtungsapparates sind für bakteriologische Zwecke nur wenig oder nicht brauchbar, wie mir wiederholte eingehende Prüfungen zeigten.

Das Prinzip der Zentralblende kann jedoch sehr vorteilhaft zur Beweglichkeitsprüfung von Mikroorganismen angewendet werden. Es ist hierzu nur notwendig, den Durchmesser der Zentralblende dem jeweils zur Anwendung kommenden Objektiv anzupassen. Genauer gesagt: Zur Erzielung eines optimalen Dunkelfeldeffektes muß die Beleuchtungsapertur auf die num. Ap. des verwendeten Objektives abgestimmt sein.

Hilfsmittel und Vorgang der Untersuchung.

Aus möglichst starkem, glasklarem Zelluloid oder aus Spiegelglas (Fotoplatten) läßt man sich runde Scheibchen schneiden, die genau in den Diaphragmenträger des Beleuchtungsapparates passen müssen. Sehr gut lassen sich auch die den Mikroskopen beigegebenen blauen (nicht mattierten!) Farbgelassen benutzen. Dann werden runde Scheibchen verschiedenen Durchmessers aus schwarzem Papier genau zentrisch auf die Gläserchen geklebt. Der optimale Durchmesser dieser Blenden kann durch ein paar Versuche leicht empirisch für jedes Objektiv ermittelt werden. Zu diesem Zweckes fertigt man sich eine Anzahl Scheibchen an, deren Durchmesser jeweils um 1 mm differieren¹. Diese Blenden werden nun nacheinander auf die Glas-

¹ Für unsere Zwecke z. B. 12 Scheibchen mit Durchmessern von 8 bis 20 mm.

plättchen geklebt, wozu man am besten Immersionsöl verwendet, damit die Scheibchen sich leicht wieder abheben lassen. Es wird dann einfach ausprobiert, welches Blendenscheibchen mit dem jeweiligen Objektiv den besten Dunkelfeldeffekt ergibt. Dieses Blendenscheibchen wird dann zum dauernden Gebrauch auf einem Gläschen oder Zelluloidplättchen dauerhaft aufgeklebt. Die zu dem vielfach im Gebrauch befindlichen zweilinsigen Kondensor n. Ap. 1,20 von ZEISS passenden Blenden sind in Abb. 1 in natürlicher Größe wiedergegeben.

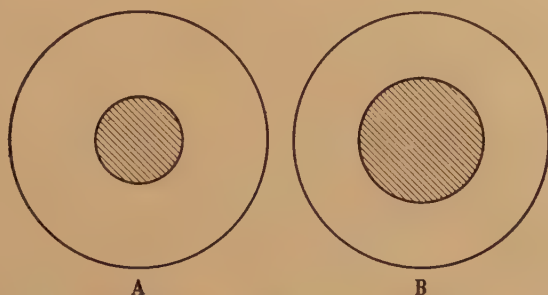


Abb. 1. Blendenscheibchen A und B, zum zweilinsigen Kondensor n. Ap. 1,20 von ZEISS passend, in natürlicher Größe. (Vergl. Tabelle I).

Für bakteriologische Zwecke ist mit einem schwachen bis mittelstarken Objektiv und möglichst starkem Okular zu arbeiten. Eine Zusammenstellung erprobter Kombinationen gibt die nachstehende Tabelle.

Tabelle I. *Günstige Kombinationen für den Kondensor n. Ap. 1,20 von ZEISS.*

Blenden- scheibchen	Objektiv	Okular	Ver- größerung
A	Leitz-Achromat 2 (6 \times) n. Ap. 0,20	20 \times 25 \times	120 \times 150 \times
	Zeiss-Apochrom. 6 \times , n. Ap. 0,15	20 \times	120 \times
	Zeiss-Achrom. 6 \times , n. Ap. 0,17	30 \times	180 \times
	Zeiss-Achrom. 8 \times , n. Ap. 0,20	20 \times 30 \times	160 \times 230 \times
	Leitz-Achrom. 3 (10 \times), n. Ap. 0,25	20 \times 25 \times	200 \times 250 \times
	Leitz-Apochrom. 16 mm, n. Ap. 0,30	20 \times 25 \times	240 \times 300 \times
	Zeiss-Achrom. 10 \times , n. Ap. 0,30	20 \times	200 \times
	Zeiss-Apochrom. 10 \times , n. Ap. 0,30	30 \times	300 \times

Tabelle I. (Fortsetzung.)

Blenden- scheibchen	Objektiv	Okular	Ver- größerung
B	Zeiss-Achrom. 20 \times , n. Ap. 0,40	20 \times	400 \times
	Zeiss-Apochrom. 20 \times , n. Ap. 0,65	30 \times	600 \times
	Leitz-Achrom. 4 (20 \times), n. Ap. 0,45	15 \times	300 \times
		25 \times	500 \times
	Leitz-Apochrom. 8 mm, n. Ap. 0,65	15 \times	345 \times
		25 \times	575 \times

Zur Beleuchtung ist eine gute Mikroskopierlampe erforderlich. Vorzüglich geeignet erwiesen sich die Modelle „Monla“ von LEITZ, „Sphärolux“, „Mikrolampe VI“ und „VII“ von ZEISS, ebenso die bekannten Punktlichtlampen. Verf. verwendet für die laufenden Untersuchungen die optische Bank der HEGENER-Kamera mit Projektionslampe, Kollektor und Irisblende in Verbindung mit dem Mikroskopstativ L von ZEISS, eine Kombination, die sich für die hier mitgeteilte Methode der Beweglichkeitsprüfung sehr gut bewährt hat. Daneben sind aber auch einfachere Beleuchtungseinrichtungen, z. B. eine starke Glühlampe (opal) mit Schusterkugel, brauchbar.

An die Präparate werden keine besonderen Anforderungen gestellt. Die Aufschwemmungen seien nicht zu dick, Objektträger und Deckgläser sauber und kratzerfrei, die Dicke der Objektträger soll 1,3 mm nicht überschreiten.

Die Einstellung des Mikroskopes, Regulierung der Beleuchtung usw. erfolgen in gleicher Weise wie bei den üblichen Hellfelduntersuchungen. Ein Kondensorwechsel ist nicht nötig, nur in den Diaphragmentträger des Beleuchtungsapparates ist das jeweils passende Blendenscheibchen einzulegen und durch Heben und Senken des Kondensors, allenfalls durch Korrektur der Spiegelstellung der optimale Dunkelfeldeffekt zu erzeugen.

Bei Verwendung des großen Beleuchtungsapparates nach ABBE kann eine genaue Zentrierung des Blendenscheibchens mittels der verstellbaren Irisfassung vorgenommen werden. Bei einfacheren Beleuchtungssystemen muß mitunter eine einmalige Korrektur der Kondensorzentrierung vorgenommen werden, um ein absolut einwandfreies Dunkelfeld ohne Azimutfehler zu erzielen.

Vorzüge des geschilderten Verfahrens sind seine große Einfachheit, die leichte Beschaffbarkeit und Billigkeit der Hilfsmittel. Die Herstellung der einfachen Deckglaspräparate erfordert wenig Zeit. Auf sorgfältigen Ausschluß von Luftblasen braucht man durchaus nicht zu achten; im Gegenteil erleichtern sie sogar mit ihrem hell leuchtenden Rand ganz wesentlich das Einstellen, ohne das Bild zu beeinträchtigen. Andererseits sammeln sich aerophile Organismen gerade um solche Luftblasen an. Die durch Kombination von schwachem Objektiv und starkem Okular bedingte Größe des Gesichtsfeldes ergibt einen ausgezeichneten Überblick und auf dem dunklen Grunde fallen bewegliche Organismen überraschend schnell auf, selbst wenn sie nur in sehr geringer

Zahl vorhanden sind. Strömungsbewegungen sind als solche leicht zu erkennen, die Brownsche Molekularbewegung kann vielfach durch eine geeignete, d. h. nicht zu starke Gesamtvergrößerung soweit „gedämpft“ werden, daß sie nicht störend in Erscheinung tritt.

Das einfache Deckglaspräparat hat gegenüber dem hängenden Tropfen keinerlei Nachteile, wie ich mich durch zahlreiche Vergleichsprüben überzeugen konnte. Durch das Miteinschließen von Luftbläschen kann man der Gefahr einer Schädigung besonders sauerstoffliebender Keime begegnen. Kommen dagegen Anaerobier zur Untersuchung, so hat das Deckglaspräparat vor dem hängenden Tropfen sogar den Vorzug. Zur Beweglichkeitsprüfung von Anaerobiern hat sich mir vielfach die Aufschwemmung der Kultur in Nährlösung + Ascorbinsäure (Cebion, Cantan, Redoxon) sehr gut bewährt.

Erfahrungen mit der Anwendung in der Praxis.

Die geschilderte Methode der Beweglichkeitsprüfung könnte aber kein anderes Interesse beanspruchen als das einer kleinen technischen Variante, wenn nicht praktische Erfahrungen besondere Vorteile nachgewiesen hätten. Von den vor allem in der ersten Zeit der Erprobung erfolgten Vergleichsuntersuchungen seien nur zwei kurz wiedergegeben.

An 483 Stämmen der *Coli-Aerogenes*-Gruppe wurden vom Verfasser und einer Assistentin gleichzeitig Beweglichkeitsprüfungen angestellt. Die Tabelle II gibt einen Überblick über die Überlegenheit der neuen Methode. Es wurde demnach nicht nur das Ergebnis günstig beeinflusst, sondern überdies ein ganz wesentlicher Zeitgewinn erzielt.

Tabelle II. Unter 483 Stämmen der *Coli-Aerogenes*-Gruppe erwiesen sich beweglich

	insgesamt	nur mit der jeweiligen Methode
im Hängetropfen	401	0
im OLDECOP-Agar	416	2
mit der neuen Methode	419	5

Zahl der in einer Stunde ausgeführten Beweglichkeitsprüfungen einschließlich der Präparatherstellung (Durchschnitt von 15 Stunden)

Untersucher:	Hängetropfen:	Neue Methode:
B.	17	34
K.	14	37

Ein 1944 mit 9 Kursteilnehmern angestellter Versuch zeigte, daß bei wenig geübten Untersuchern die oben genannten Vorzüge des hier mitgeteilten Verfahrens ebenso deutlich oder noch stärker zum Ausdruck kommen. Jeder Prüfling erhielt 10 Stämme, die, wie die unmittelbar vorher vorgenommene Prüfung zeigte, beweglich waren; z. T. allerdings nur wenige Individuen (*Azotobacter*, *Bact. radiobacter*, *Bact. coli* usw.).

im Hängetropfen:			mit der neuen Methode:		
bewegl.	unbewegl.	benötigte Zeit (Summe)	bewegl.	unbewegl.	benötigte Zeit (Summe)
76	14	9 Std. 20 Min.	88	2	4 Std. 35 Min.

Endlich sei noch erwähnt, daß sich dem Verf. die geschilderte Versuchsanordnung nicht nur bei *Bakterien*, sondern auch bei der Untersuchung anderer, sowohl pflanzlicher als auch tierischer Mikroorganismen (*Algen*-Schwärmer, *Pilz*-Zoosporen, *Flagellaten*, *Infusorien* usw.) seit fast 10 Jahren bestens bewährt hat.

Zusammenfassung.

Es wird ein vom Verf. seit Jahren erprobtes Verfahren zur Beweglichkeitsprüfung bei Bakterien beschrieben. Es erfordert bei geringsten Hilfsmitteln und bestmöglichen Ergebnissen ein Minimum an Zeit.

Die Vorteile werden an Hand einiger Beispiele aus der Praxis besprochen. Das Verfahren eignet sich auch zur Untersuchung anderer beweglicher Mikroorganismen.

Zur Frage der Endokonidienbildung* bei *Sporendonema casei* Desm.

Von

SIEGFRIED WINDISCH.

(Eingegangen am 2. September 1948.)

Sporendonema casei ist 1826 von DESMAZIÈRES beschrieben worden. Das wichtigste Merkmal dieses *Fungus imperfectus* ist, wie schon der Name andeutet, seine angeblich endogene Konidienbildung. Obwohl schon mehrfach (LINDAU, HENNEBERG) Zweifel daran geäußert worden sind, haben doch auch LEMBKE und DELITSCH, die letzten Bearbeiter dieses Pilzes, daran festgehalten, daß es sich bei den vegetativen Vermehrungszellen dieses Pilzes tatsächlich um Endokonidien handele, die also erst durch Zerbrechen der sie umschließenden Zellen frei werden, wie auch BAINIER und LOUBIÈRE angenommen hatten. Diese Auffassung wird allerdings dadurch bestärkt, daß die in Frage stehenden Zellen einzeln oder hintereinander in unverzweigten oder auch verzweigten Seitenhyphen stehen. Bei Untersuchung von *Sporendonema casei* stiegen erneut Zweifel auf, ob die fraglichen Vermehrungszellen als Endokonidien aufzufassen sind. Daher wurden diese Gebilde näher untersucht.

Ausgangspunkt für die Zweifel an ihrer endogenen Natur waren die Befunde bei *Geotrichum*- und *Oospora*-Arten. Eigene Studien an diesen Pilzen haben gezeigt, daß sie neben der durchweg verbreiteten primären Gliedsporenbildung, d. h. dem einfachen direkten Zerfall beliebiger Zellen des ganzen Thallus, sich auch durch sekundäre Gliedsporen vermehren. Zellen mit Zerfall in sekundäre Gliedsporen zeigen nämlich manchmal ähnliche Bilder wie die Vermehrungszellen des *Sporendonema casei*. Ein deutlicher Unterschied der Gliedsporenbildung bei *Geotrichum* und *Oospora* gegenüber *Sporendonema casei* ist, daß die spezifischen Vermehrungszellen bei letzterem auf Seitenzweige beschränkt sind, während die Gliedsporenbildung gewöhnlich nicht auf Seitenzweige beschränkt bleibt.

Sekundäre Gliedsporen entstehen durch Aufteilung und Zerfall primärer Gliedsporen. Der sekundäre Zerfall kann nach dem Freiwerden der primären Gliedsporen oder auch schon erfolgen, solange letztere noch im Hyphenverband stehen. Bei dem sekundären Zerfall kann die primäre Gliedspore in zwei oder mehrere etwa gleich große Zellen zerfallen. Namentlich bei

* Diese in der Spezialliteratur übliche Bezeichnung ist hier beibehalten, obwohl die strenge Definition der Konidie auf die exogene Entstehung beschränkt ist.

Oospora-Arten zieht sich häufig das Plasma nach den beiden Zellenden zusammen und bildet dort je eine Gliedspore, wobei der Mittelteil der Zelle leer wird. Der obere und untere Teil der Zelle wird durch je eine Querswand sauber abgeteilt. Dabei entstehen oft kubisch scheinende, kurz-zylindrische bzw. nach Abrundung der Kanten kugelige Zellen als sekundäre Gliedsporen, die vielfach schon zu der Vermutung Anlaß gegeben haben, daß der betreffende Pilz auch zur hefeartigen Sprossung befähigt sein wird. Wird nun das Zellplasma nicht nach den Zellenden zusammengezogen, sondern bleibt es gleichmäßig verteilt und tritt dann eine Aufteilung in Zellen ein, die etwa so lang wie breit oder gar kürzer sind, so können Bilder entstehen, wie sie den früheren Untersuchern des *Sporendonema casei* vorgelegen haben mögen und die sie zu der Annahme veranlaßt haben, die vorgefundenen Vermehrungszellen als Endokonidien aufzufassen.

Der wesentliche Unterschied zwischen Endokonidien, vorausgesetzt, daß sie in einer Reihe hintereinander stehen, und sekundären Gliedsporen besteht darin, daß die Einzelzellen a) wenn es Endokonidien sind, noch von der Wand der Mutterzelle umschlossen werden, daß sie aber b) wenn es sekundäre Gliedsporen sind, keine Mutterzellwand um sich haben. Dieser Unterschied ermöglicht folgende Überlegung: Vegetative Hyphen ohne Vermehrungszellen müßten sich bei einer Zerreißprobe mit der Glasnadel eines Mikromanipulators wie Bindfäden verhalten, d. h. nach Überschreiten ihrer Elastizitätsgrenze müßten sie, wahrscheinlich an den Septen, zerreißen. Diese Vermutung müßte ein Versuch mit der Mikromanipulatornadel bekräftigen. Handelt es sich bei den fraglichen Vermehrungszellen um Endokonidien, so müßten bei einer Zerreißprobe die Fäden entweder zellenweise zerreißen, wobei die Endokonidien in den Zellen verbleiben, oder es müßten die Einzelzellen unter Entlassung der Endokonidien zerreißen. Handelt es sich dagegen bei den Vermehrungszellen um reife Gliedsporen, so dürfte keine Elastizität des Fadens festzustellen sein, und die Zellen müßten ohne merklichen Widerstand auseinander geschoben werden können.

Um diese Möglichkeiten durch den Versuch zu entscheiden, wurde *Sporendonema casei* (der Stamm war vom Centraalbureau voor Schimmelcultures in Baarn bezogen worden) reichlich in Molke mit 3% NaCl (nach der Vorschrift von LEMBKE und DELITSCH) geimpft. Von dieser Suspension wurden Tröpfchenkulturen angelegt. Der Pilz wuchs langsam an. Nach etwa 2—3 Wochen fand sich, daß der Pilz das Deckglas dünn überwachsen und viele Seitenzweige mit Vermehrungszellen gebildet hatte. Der Pilz war aus den Tröpfchen hinausgewachsen, und auch die Seitenzweige lagen dem Deckglas an. Nach vorsichtigem Abheben wurde das Deckglas umgekehrt hingelegt und bei 100-facher Vergrößerung mit der Mikromanipulatornadel die Zerreißprobe angestellt. Wie vermutet, waren die vegetativen Hyphen elastisch und rissen schließlich. Die Seitenzweige mit Vermehrungszellen ließen sich dagegen ohne weiteres auseinanderschieben, so daß die einzelnen, bisher als Endokonidien angesprochenen Zellen einzeln lagen, ohne daß Trümmer von Zellen, in denen sie enthalten

gewesen sein könnten, zu sehen waren. Somit handelt es sich bei den vegetativen Vermehrungszellen des *Sporendonema casei* nicht um Endokonidien, sondern um Gliedsporen, Arthrosporen im Sinne von VUILLEMIN. Die Gliedsporen sind bei diesem Pilz so kurz, wie es bei *Oospora*-Arten nur die sekundären Gliedsporen sind. Ihre charakteristische Form und ihre ausschließliche Bildung an Seitenzweigen rückt sie dem gewöhnlichen Konidienbegriff näher als den Arthrosporen, wenngleich sie entwicklungsmäßig als solche anzusehen sind.

Literatur.

- BAINIER, G.: Bull. Soc. Myc. France **23**, 23 (1907).
DESMAZIÈRES: Ann. des Sci. nat. 1826.
HENNEBERG, W.: Handbuch der Gärungsbakteriologie 2. Band, Berlin. Parey, 1926.
LEMBKE, A. u. H. DELITSCH: Ergebnisse der Mikrobiologie Bd. 1, Neumann, Neudamm, 1943. — LINDAU, G.: Hyphomycetes in Rabenhorsts Kryptogamenflora Abt. 8, 1907 und Abt. 9, 1910. — LOUBIÈRE, A.: Recherches sur les Mucédinées caséicoles, Thèse Paris 1924.
RITTER, U.: Milchwirtschaftl. Forschgn. **11**, 163 (1930).
VUILLEMIN, P.: Bull. Soc. Sci. Nancy **11**, 129 (1910).

(Aus dem Kaiser-Wilhelm-Institut für Medizinische Forschung, Heidelberg.)

Beiträge zur Systematik der *Volvocales*-Gattung *Polytoma*. I. Die Arten mit kugeligen Formen.

Von

FRANZ MOEWUS

Mit 7 Textabbildungen.

(Eingegangen am 15. Oktober 1948.)

Die letzte systematische Übersicht über die Gattung *Polytoma* verdanken wir A. PASCHER (1927). Zu dieser Gattung gehören alle chlorophyllosen, zweigeißligen *Volvocales*, deren Membran außer der Papille keine besonderen Ausgestaltungen besitzt; als Assimilationsprodukt wird Stärke gebildet (PRINGSHEIM 1927). ONDRATSCHEK (1941) fordert im Anschluß an CZURDA (1935), daß die Untersuchung an im Normalzustand befindlichen Zellen vorgenommen werden muß, d. h. an Zellen, die sich im „Lebenszustand höchster Vermehrungsfähigkeit“ befinden.

In diesem Stadium gewährt das Individuengemisch einen vollkommen homogenen Anblick. Nach dem Überschreiten der Teilungsphase nimmt die Einheitlichkeit des Zellgemisches ab: es kommt zum Degenerationszustand. Die Zellen reichern in der Regel Reservestoffe an. Werden Zellen dieses Stadiums in eine günstige Nährlösung gebracht, so setzen sofort Teilungen ein. Im Laufe dieses Stadiums, das als Regenerationszustand bezeichnet wird, wird allmählich der Normalzustand wieder hergestellt. Es ist erstrebenswert, die Zellen stets im Normalzustand zu untersuchen. Das ist praktisch nicht immer durchführbar, weil nicht jede Art in Kultur genommen wird. Jedoch lassen sich die meisten *Polytoma*-Arten nach der Peptonfaulkultur-Methode züchten: auf dem Boden einer sterilen, mit Watte oder Zellstoff verschlossenen Pulverflasche (von 200—250 ccm Inhalt) kommen 0.2—0.4 g Pepton, darüber in 2 cm hoher Schicht sterile Gartenerde, dann wird mit sterilem Leitungswasser vorsichtig aufgefüllt (vgl. STREHLOW 1929). In diesem Medium gedeihen fast alle *Polytoma*-Arten ausgezeichnet. Nach einer bestimmten Zeit sind nahezu alle Zellen, die eine sehr dichte Suspension bilden, in Teilung, d. h. im Normalzustand. Bakterien in diesen Kulturen liefern durch Abbau des Peptons die für *Polytoma* geeigneten Nährstoffe. Auch Klonkulturen können nach dieser Methode angelegt werden. Für ernährungsphysiologische Untersuchungen sind natürlich bakterienfreie Kulturen erforderlich. Für die Beurteilung der morphologischen Eigenschaften einer *Polytoma*-Zelle sind aber die nach der Peptonfaulkulturmethode gezüchteten Klone völlig ausreichend. Bei Beobachtung von im Freien gesammelten Populationen muß man sehr

vorsichtig sein, selbst wenn der Normalzustand vorzuliegen scheint. Denn es ist schwer zu entscheiden, ob eine Art oder mehrere Arten bzw. Rassen in einem solchen Material vorhanden sind. Wir müssen heute die Forderung stellen, daß Beschreibungen von Arten oder Rassen nur an genetisch gleichartigem Material, d. h. an Klonen, vorgenommen werden.

Man hat die Gattung *Polytoma* als „farblose Ausgabe“ der Gattung *Chlamydomonas* bezeichnet. Es gibt einige *Chlamydomonas*-Arten mit stark reduziertem Chloroplasten, die als Übergangsformen zur chlorophyllfreien *Polytoma* angesehen werden können. Im systematischen Teil wird darauf hingewiesen, daß einige *Polytoma*-Arten in bestimmten Merkmalen mit *Chlamydomonas*-Arten übereinstimmen. Ob es sich dabei um mehr als eine Analogie handelt, muß vorerst offen bleiben. Vielleicht erhielten wir Anhaltspunkte, wenn wir versuchten, *Polytoma* mit *Chlamydomonas* zu bastardieren. Derartige Versuche sind noch nicht unternommen worden. Innerhalb der Gattung *Chlamydomonas* sind bereits drei Artenkreise mit Sicherheit bekannt: 1. die *eugametos*-Gruppe (MOEWUS 1940), 2. die *paradoxa*-Gruppe (HARTMANN 1934, MOEWUS 1936), 3. die *monoica*-Gruppe (STREHLOW 1929). Zu jeder Gruppe gehören 3—5 Arten. Die Arten jeder Gruppe sind untereinander kreuzbar. Jedoch ist es nicht möglich, Arten der 1. Gruppe mit Arten der 2. und 3. Gruppe zu kreuzen, ebensowenig gelingen Kreuzungen zwischen Arten der 2. und 3. Gruppe. Es scheint demnach in der Gattung *Chlamydomonas* einige Artenkreise zu geben, die wenig miteinander verwandt sind. Möglicherweise gibt es auch in der Gattung *Polytoma* solche kreuzungssterilen Artenkreise. Deren Nachweis wäre für die Systematik von Bedeutung. Bisher ist die Bastardierung von zwei *Polytoma*-Arten beschrieben worden, und zwar von *P. „uvella“* mit *P. Pascheri* (MOEWUS 1935, 1937). Die Bastardzygoten waren normal keimfähig; aus den Tetradenanalysen ergab sich, daß die Chromosomen-garnituren beider Arten homolog sind.

Die Zahl der Eigenschaften einer *Polytoma*-Zelle ist, wenn wir die mikroskopische Untersuchung bei 6—1200facher Vergrößerung als genügendes Hilfsmittel ansehen, beschränkt. Wir können bestimmen:

1. die Zellgröße an erwachsenen, kurz vor der Teilung stehenden oder in Teilung befindlichen Zellen: angegeben wird die größte Länge und Breite in μ .
2. die Zellform durch Zeichnen mit dem Zeichenapparat; dabei ist darauf zu achten, daß die Zellen in der Geißelebene und senkrecht dazu beobachtet werden, um evtl. vorhandene Asymmetrien zu erkennen.
3. die Dicke der Zellmembran läßt sich nicht in μ angeben; von einer dünnen Membran sprechen wir, wenn sie dem Protoplasten so eng anliegt, daß sie von diesem kaum unterschieden werden kann und erst nach Plasmolyse der Zellen sichtbar wird; andernfalls ist die Membran als derb zu bezeichnen.
4. die anliegende oder abgehobene Membran; die Membran kann dem Protoplasten allseitig anliegen oder sie steht am basalen Ende bzw. an weiteren Teilen der Zelle vom Protoplasten ab.
5. die Membranpapille, ihr Vorhandensein oder Fehlen oder ihre Form.

6. die Plasm a p a p i l l e, ihr Vorhandensein oder Fehlen; eine Plasm a p a p i l l e kommt dadurch zustande, daß am Vorderende der Protoplast schnabelartig zusammengezogen ist.
7. der Aug e n f l e c k (Stigma), sein Vorhandensein oder Fehlen, seine Größe, Form und Lage in der Zelle.
8. die G e i ß e l l ä n g e wird als x-fach körperlang angegeben.
9. die G e i ß e l h a l t u n g; dieses bisher wenig beachtete Merkmal ist von systematischer Bedeutung; die Geißeln können beim Schwimmen nach vorn gerichtet oder nach hinten zurückgeschlagen sein.
10. die G e i ß e l i n s e r t i o n; bei Fehlen einer Papille können die Geißeln dicht nebeneinander oder voneinander entfernt durch die Zellmembran treten; bei Vorhandensein einer Papille kann die Geißelinsertion verschieden sein.
11. die k o n t r a k t i l e n V a k u o l e n, ihre Zahl und Lage in der Zelle.
12. die T o c h t e r z e l l e n, ihre Zahl im Zoosporangium und ihre Form in der Mutterhülle.
13. die S e x u a l i t ä t, die Zahl der Gameten im Gametangium, die morphologischen Eigenschaften der Gameten, morphologische Geschlechtsverschiedenheiten, Kopulationsverlauf, Geschlechterverteilung (Monözie, Diözie).
14. die Z y g o t e, ihre Größe, Form, Farbe, Membranausgestaltung, Keimungsart; evtl. Form und Bildung einer Planozygote.
15. die B i l d u n g v o n P a l m e l l e n.
16. die B i l d u n g v o n A p l a n o s p o r e n u n d A k i n e t e n, deren Größe, Form und Farbe zu bestimmen ist.

Auch der Lage des Zellkerns (Zellmitte, vordere oder hintere Zellhälfte) scheint eine Bedeutung zuzukommen. Mit Ölimmersion läßt er sich an lebenden Zellen deutlich erkennen. Ebenso scheint die Form und Größe der Stärkekörner artspezifisch zu sein. Untersuchungen über die Stärkekörner bei *Polytoma*-Arten wären sehr erwünscht.

Um eine *Polytoma*-Zelle abzubilden, genügt es, wie es bereits ONDRATSCHEK (1941) getan hat, die Zellumrisse einschließlich der Papille zu zeichnen. Vom Inhalt sind anzugeben: die kontraktile Vakuolen, der Augenfleck und der Zellkern. Auch die Geißeln dürfen nicht vergessen werden. Denn die Zeichnung ist ein wichtiger systematischer Beleg. Ist die Zellmembran dünn, dann wird nur eine Umrißlinie, ist sie derb, werden zwei Umrißlinien gezeichnet.

Die vorläufig abgeschlossenen Untersuchungen sollen in mehrere Teile gegliedert werden; in dem vorliegenden Teil I werden die kugelförmigen Arten behandelt, später die ellipsoidischen, zylindrischen, ovalen und speziell geformten Arten. Dann sollen ein Bestimmungsschlüssel und einige genetische Experimente zur Aufstellung von Artenkreisen folgen.

I. Die kugelförmigen *Polytoma*-Arten.

Kugelige Formen sind in der Regel leicht als solche erkennbar. Oft beobachtet man in solchen Klonkulturen auch ellipsoidisch geformte Zellen. Das ist darauf zurückzuführen, daß bei manchen Arten die gerade frei gewordenen Tochterzellen ellipsoidisch sind. Nach der ein-

gangs aufgestellten Forderung dürfen aber nur kurz vor der Teilung stehende oder in Teilung befindliche Zellen untersucht werden. Wird das getan, dann stellt sich heraus, daß die Zellen alle kugelig sind. Bisher ist nur eine zu dieser Gruppe gehörige Art beschrieben worden, *P. tetraolare* Pascher (1927). Fünf neue Arten und eine umbenannte, von ONDRATSCHEK (1941) beschriebene Art werden im folgenden angeführt. Alle *Polytoma*-Arten sollen der Reihe nach nummeriert werden.

1. *Polytoma microsphaericum* Moewus nov. spec.

Zellen kugelig, 5—7 μ , Membran dünn, anliegend, ohne Papille und ohne Plasmapapille. Augenfleck äquatorial, scheibenförmig, klein. Geißeln zweimal körperlang, nach vorn gerichtet, dicht nebeneinander inseriert. Vorn zwei kontraktile Vakuolen. Durch Längsteilung zwei breit ellipsoidische Tochterzellen. Kern zentral. Stärkekörner klein, kugelig. Sexualität und andere Stadien unbekannt. Abb. 1 a und b. Gefunden im botanischen Garten Berlin-Dahlem 1933.

Wenn es auch meist nicht möglich ist, die betreffende Form einige Zeit nach dem Sammeln an dem gleichen Standort wieder zu finden, erscheint es doch angebracht, den Fundort stets anzugeben. Es ist vielleicht später einmal interessant, die verschiedenen Fundorte zu vergleichen.

Klone dieser Art sind in Peptonfaulkulturen gezüchtet worden. Die Zellen vermehren sich darin ausgezeichnet. Die Geißeln sind beim Schwimmen stets nach vorn gerichtet. Die Form des Augenflecks erkennt man, wenn man die Zellen von oben, in der Geißelebene und senkrecht dazu betrachtet. In welcher Weise diese Art ungünstige Lebensbedingungen überdauert, ist noch unbekannt. In Peptonfaulkulturen, die längere Zeit nicht übertragen worden sind, gehen die Zellen zugrunde, ohne daß es zur Bildung von Gameten oder Ruhezuständen kommt.

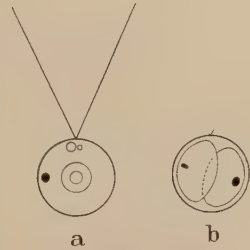


Abb. 1. *Polytoma microsphaericum*. a = vegetative Zelle
b = Zelle in Teilung. Vergr.
2000 \times .

2. *Polytoma tetraolare* Pascher (1927).

Zellen kugelig, 14—17 μ , Membran dünn, ohne Papille, vom Vorderende ab nach hinten allmählich zunehmend vom Protoplasten abgehoben. Protoplast an der Geißelaustrittsstelle zu einer kleinen Plasmapapille vorgezogen. Augenfleck äquatorial oder etwas oberhalb, klein, strichförmig. Geißeln zweimal körperlang, nach vorn gerichtet, dicht nebeneinander inseriert. Vorn vier kontraktile Vakuolen. Zwei oder vier ellipsoidische Tochterzellen, Teilung der Länge nach angelegt, dann Querdrehung. Kern vor der Zellmitte. Stärkekörner groß, länglich. Isogamie. Monözie. Planozygote breiter als lang, 2—3 Tage beweglich. Zygote ellipsoidisch, 16:10 μ , mit streifigen Verdickungsleisten, blaßrot gefärbt, bei der Keimung vier ellipsoidische Gonen liefernd. Abb. 2 a—d. Gefunden im botanischen Garten in Prag

zwischen faulenden *Tribonemen*, im Garten des pflanzenphysiologischen Instituts in Berlin-Dahlem in abgestorbenen *Spirogyra*-Watten.

In Peptonfaulkulturen (Klone) bildet *P. tetraolare*, nachdem gealterte, im Degenerationszustand befindliche Zellen übertragen worden sind, durch Aufteilung in acht Zellen Gameten von ellipsoidischer Form. Diese verschmelzen paarweise zu einer viergeißligen Planozygote, die

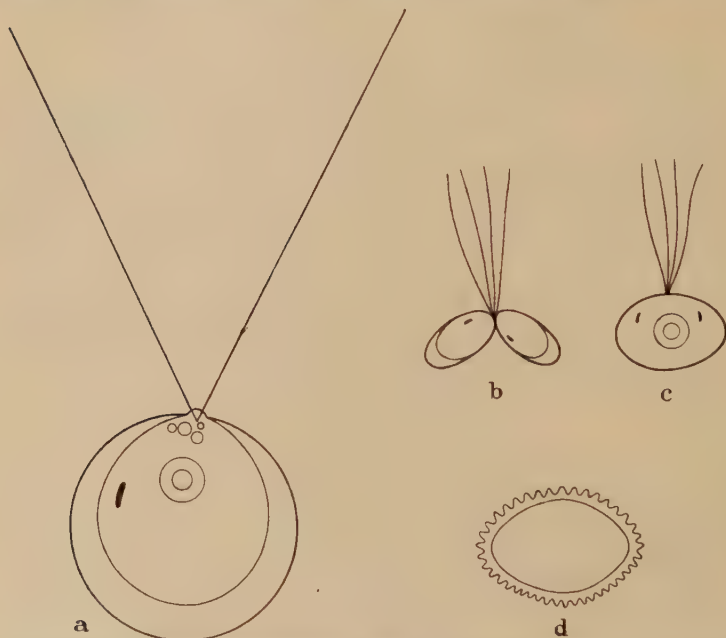


Abb. 2. *Polytoma tetraolare*. a = vegetative Zelle, b = Kopulationspaar, c = Planozygote, d = Zygote. Vergr. a—c 2000 \times , d 1500 \times .

breiter als lang ist und 2—3 Tage umherschwimmt. Nach dem Abwerfen der Geißeln wird eine ellipsoidische Zygote gebildet, bei deren Keimung vier Gonen entstehen. Da die von einer Klonkultur gebildeten Gameten kopulieren, ist *P. tetraolare* monözisch. PASCHER (1927, p. 391) gibt als Durchmesser 9—17 μ an. Diese Variationsbreite erklärt sich dadurch, daß er auch nicht ausgewachsene Zellen gemessen hat. *P. tetraolare* ist vor allem durch die Größe, durch die abstehende Membran und durch die vier kontraktile Vakuolen von *P. microsphaericum* und anderen kugeligen *Polytoma*-Arten unterschieden.

3. *Polytoma pseudotetraolare* (Ondratschek 1941) Moewus nov. nom.

Zellen kugelig, 8—11 μ , selten breit ellipsoidisch, dann 10:8 μ , mit dünner, anliegender Membran ohne Papille. Ohne Augenfleck. Geißeln $1\frac{1}{2}$ mal körperlang, dicht nebeneinander inseriert, nach vorn gerichtet. Keine Plasmapipe. Vorn vier kontraktile Vakuolen. Zwei oder vier ellipsoidische Tochterzellen. Kern zentral. Stärkekörner kugelig. Isogamie.

Monözie. Kugelige Planozygote bis 7 Tage umherschwimmend. Zygote kugelig, 10 μ , mit glatter Membran. Abb. 3 a—d. Fundort unbekannt.

Diese Art ist von ONDRATSCHEK (1941) als *P. tetraolare* var. *astigmatum* beschrieben worden. An Hand einer aus Prag übersandten

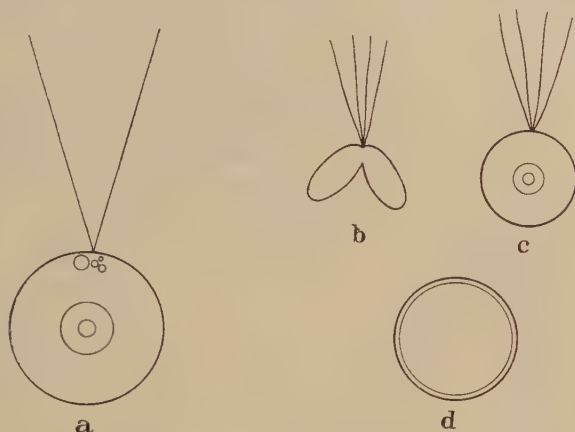


Abb. 3. *Polytoma pseudotetraolare*. a = vegetative Zelle, b = Kopulationspaar, c = Planozygote, d = Zygote. Vergr. a 2000 \times , b—d 1500 \times .

Kultur konnte sie mit der vorigen Art verglichen werden. Es ergab sich eindeutig, daß sie von dieser verschieden ist. Die Unterschiede bestehen in folgenden Merkmalen: 1. Zellgröße. Der Durchmesser der Zellen beträgt nur 8—11 μ . 2. Zellform. Die Zellen, die sich gerade zur Teilung anschicken, sind nicht immer kugelig, sondern gelegentlich breit ellipsoidisch, so daß sich die von ONDRATSCHEK gegebenen Ausmaße von 10 : 8 μ ergeben. In Peptonfaulkulturen, in denen sich die Zellen stark vermehren, sind etwa 90 % aller Zellen kugelig. 3. Zellmembran. Sie ist niemals abgehoben, auch in alternden Kulturen nicht. ONDRATSCHEK bildet auch keine abgehobene Membran ab. 4. Der Augenfleck fehlt. 5. Die Geißeln sind nur 1½mal körperlang. 6. Der Kern liegt zentral, nicht oberhalb der Zellmitte. In Peptonfaulkulturen konnte auch Gametenbildung ausgelöst werden. Die zu vier entstehenden ellipsoidischen Gameten einer Klonkultur verschmelzen zu einer kugelförmigen Planozygote, die 5—7 Tage umherschwimmt. Die kugelige Zygote hat eine glatte Membran und nur einen Durchmesser von 10 μ . In den Eigenschaften der Planozygote und der Zygote unterschieden sich beide Arten sehr wesentlich. Es sei hier schon hervorgehoben, daß beide Arten nicht miteinander bastardierbar waren, so daß die von ONDRATSCHEK beschriebene Form nicht eine Rasse von *P. tetraolare*, sondern eine selbständige Art darstellt.

4. *Polytoma palmelloides* Moewus nov. spec.

Zellen kugelig. 18—22 μ , mit derber Membran, ohne Papille. Membran rings um den Protoplasten gleichmäßig abgehoben. Protoplast mit großer

Plasmapapille. Augenfleck im ersten Zelldrittel, kugelig. Geißeln einmal körperläng, nach vorn gerichtet, weit voneinander inseriert. Vorn zwei kontraktile Vakuolen. Vier kugelige Tochterzellen. Kern zentral. Stärkekörner

kugelig. Sexualität unbekannt. Palmellenlager aus 8 oder 16 Zellen. Gefunden in der Umgebung von Gießen 1930. Abb. 4a und b.

Für *P. palmelloidea* ist die derbe, gallertige, abstehende Membran, die Plasmapapille und die Ausbildung kleiner palmelloider Lager charakteristisch. Derartige Palmellen sind bisher für keine *Polytoma*-Art

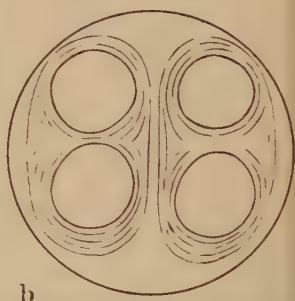
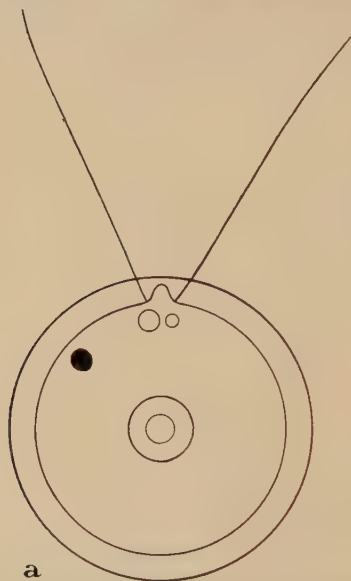


Abb. 4. *Polytoma palmelloidea*. a = vegetative Zelle, b = 4-zelliges Palmellenlager. Vergr. 2000×

beschrieben worden. In Peptonfaulkulturen entstehen im bakteriellen Oberflächenhäutchen diese Lager.

5. *Polytoma macrosphaericum* Moewus nov. spec.

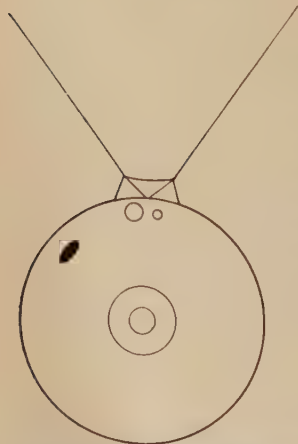


Abb. 5. *Polytoma macrosphaericum*. Vegetative Zelle. Vergr. 2000×

Zellen kugelig, 16–20 μ , Membran dünn, anliegend, zu einer großen, scharf abgesetzten Papille in Form eines vorn eingedellten Kegels stumpf verdickt. Geißeln $\frac{3}{4}$ mal körperläng, an den oberen Kanten der Papille austretend. Keine Plasmapapille. Augenfleck ellipsoidisch, an der Grenze des ersten und zweiten Zelldrittels. Vorn zwei kontraktile Vakuolen. Kern zentral. Vier kugelige Tochterzellen. Stärkekörner sehr klein, kugelig. Sexualität und andere Bildungen unbekannt. Gefunden auf den Rieselfeldern Dülmen in Westfalen, 1932, Abb. 5.

Charakteristisch für *P. macrosphaericum* ist die Papillenform und die Art des Geißelaustritts. Derartig eingedellte Papillen sind auch bei *Chlamydomonas* nicht beschrieben worden.

6. *Polytoma uliginosum* Moewus nov. spec.

Zellen kugelig, 20—25 μ , Membran dünn, anliegend, zu einer kegelstumpfformigen Papille verdickt. Geißeln körperlang, an der Ansatzstelle der Papille hervortretend, nach vorn gerichtet. Ohne Augenfleck. Keine Plasmapipe. Vorn zwei kontraktile Vakuolen. Kern in der vorderen Zelhälfte. Vier kugelige Tochterzellen. Stärkekörner groß, kugelig. Sexualität und andere Bildungen unbekannt. Gefunden im Plagfenn bei Chorin (Brandenburg), 1931, Abb. 6.

Von der vorigen Art durch die Papillenform und den Geißelaustritt, sowie durch das Fehlen des Augenfleckes deutlich unterschieden.

7. *Polytoma oogamum* Moewus
nov. spec.

Zellen kugelig, 25—30 μ , Membran derb, anliegend, mit kegelstumpfformiger, abgesetzter Papille, ohne Plasmapipe. Geißeln körperlang, nach vorn gerichtet, an der Papillenansatzstelle austretend. Vorn zwei kontraktile Vakuolen. Kern zentral. Augenfleck äquatorial, klein, kurz strichförmig. Stärkekörner kugelig. Vier oder acht ellipsoidische Tochterzellen. Spermatozoiden ellipsoidisch, zu 32, mit zweimal körperlangen Geißeln, ohne Augenfleck, nur 6 : 4 μ groß. Oogamie. Monözie. Zygote kugelig, glattwandig. 25 bis 30 μ , mehrschichtige Membran. Isoliert aus zwei Jahre altem Grundschlamm von einem Teiche in Posen. Abb. 7 a—j.

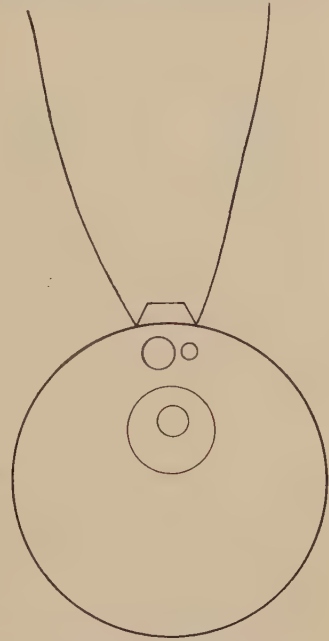


Abb. 6. *Polytoma uliginosum*. Vegetative Zelle. Vergr. 2000 \times .

P. oogamum vermehrt sich in Peptonfaulkulturen nur langsam. Etwas günstiger ist die Entwicklung, wenn statt Pepton Blutfibrin verwendet wird. In Klonkulturen, die mit Blutfibrin angesetzt waren, konnte die geschlechtliche Fortpflanzung genauer verfolgt werden. Zum ersten Mal wurde für eine *Polytoma*-Art Oogamie festgestellt. Trotz Oogamie war die Geschlechterverteilung monözisch. In einer Klonkultur verliert ein Teil der ausgewachsenen Zellen die Geißeln. Sie werden damit zu Eizellen, die sich in kurzer Zeit auf 30—40 μ vergrößern (Abb. 7b); dabei bleibt die Papille deutlich sichtbar, sie ist nur etwas breiter geworden. Andere vegetative Zellen teilen sich schnell fünfmal hintereinander in 32 ellipsoidische Spermatozoiden von 6 : 4 μ Größe auf. Die Spermatozoiden haben zweimal körperlange Geißeln, aber keinen Augenfleck; ihre Papille ist im Verhältnis zur Zellgröße sehr mächtig (Abb. 7c). Mustert man unter dem Mikroskop einen Tropfen durch, in dem sich Eizellen und Spermatozoiden befinden, dann sieht man, daß sich um die großen Eizellen, in der Nähe ihrer Papille, 3—8

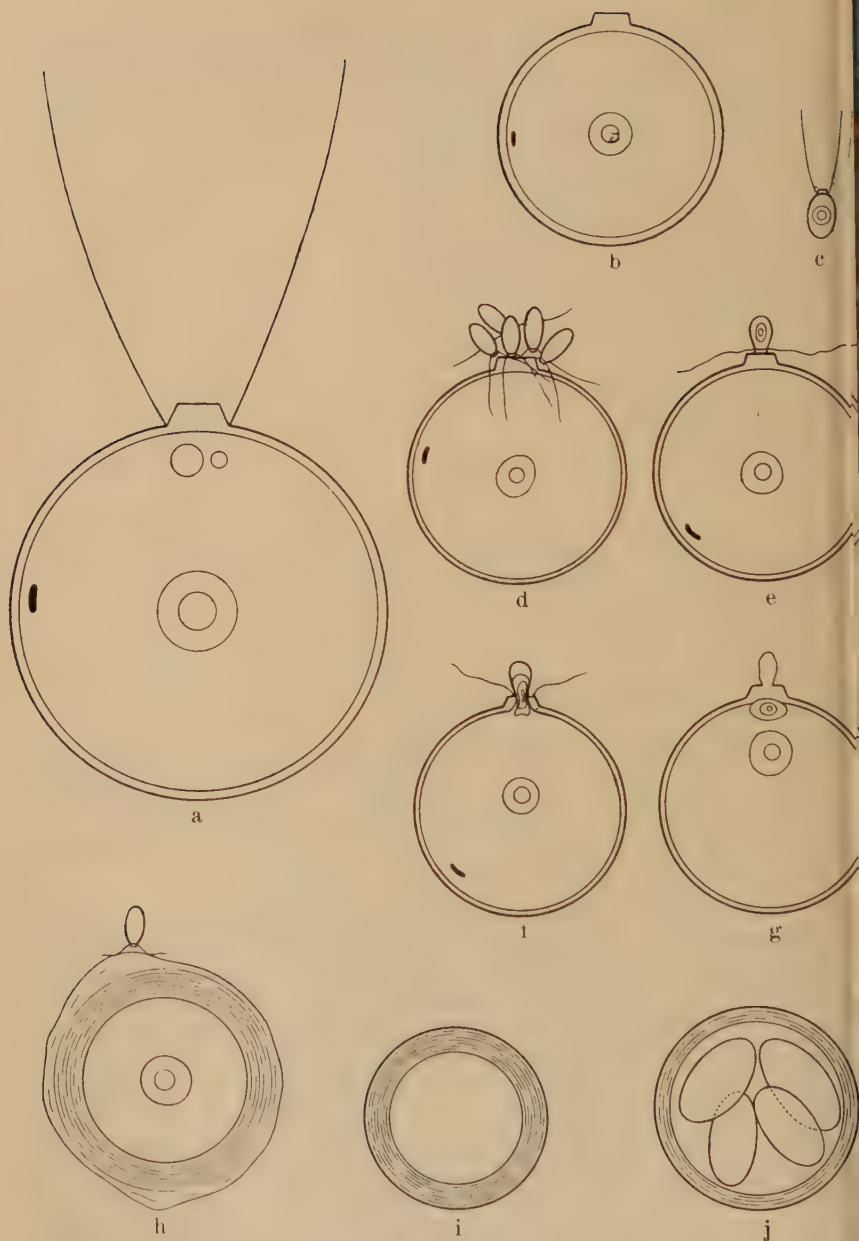


Abb. 7. *Polytoma oogamum*. a = vegetative Zelle, b = Eizelle, c = Spermatozoid, d = Eizelle von Spermatozoiden angeschwärmt, e = ein Spermatozoid beginnt mit der Eizelle zu verschmelzen, f = Eindringen des Spermatozoid-Protoplasten, g = Spermatozoid eingedrungen, der Eikern wandert ihm entgegen, h = Ausscheiden der Zygotenmembran, i = Zygote mit mehrschichtiger Membran, j = keimende Zygote mit 4 Gonien. Vergr.: a 2000 \times , b–j 1000 \times .

Spermatozoiden ansammeln (Abb. 7d). Größere Gruppen kamen nicht zur Beobachtung. Ein Spermatozoid verschmilzt dann mit der Eizelle. Die Verschmelzung beginnt an den Papillen (Abb. 7e). Der Inhalt des Spermatozoids wandert durch die enge Öffnung von Papillenbreite in die Eizelle (Abb. 7f), bis schließlich die leere Spermatozoidenhülle der Eizelle aufsitzt (Abb. 7g). In der Eizelle ist der Spermatozoid-Protoplast mit dem kleinen Kern deutlich erkennbar. Der anfangs zentral gelegene Eikern wandert zum Spermatozoiden und dort erfolgt die Karyogamie. Die kugelige Zygote, deren Membran aus mehreren Schichten besteht (Abb. 7h, i), hat einen Durchmesser von 25–30 μ . Der Inhalt färbt sich nach einiger Zeit rötlich. Nachdem das Spermatozoid in die Eizelle eingedrungen ist, werden von innen her mehrere Membranschichten unter Kontraktion des Inhalts ausgeschieden (Abb. 7h); die äußere Hülle der Eizelle mit der aufsitzenden Spermatozoidmembran zerreißt. Bei der Zygotenkeimung entstehen vier ellipsoidische Gonen (Abb. 7j). Die vier Gonen einer Zygote wurden getrennt aufgezogen. In jeder der vier Gonenkulturen fanden später Kopulationen statt, ein Beweis dafür, daß *P. oogamum* monözisch ist.

II. Übersicht über die kugeligen *Polytoma*-Arten.

Um einen Überblick über die Eigenschaften der bisher bekannten sieben *Polytoma*-Arten, die eine kugelige Gestalt haben, zu gewinnen, sind die systematisch wichtigsten Merkmale in den Tabellen 1 und 2 zusammengestellt worden. Wir entnehmen den Tabellen, daß sich die sieben Arten jeweils in mehreren Merkmalen unterscheiden. Die Zusammenfassung der kugeligen Arten besagt keinesfalls, daß sie miteinander verwandt sind. Dafür liegt nicht der geringste Anhaltspunkt vor. Es ist schon darauf hingewiesen worden, daß *P. tetraolare* und *P. pseudotetraolare* nicht bastardierbar sind. Gameten beiderlei Arten zeigen nicht die geringste Affinität zueinander. Darüber wird im letzten Teil dieser Serie von Arbeiten näher berichtet werden. Will man aber *Polytoma*-Arten bestimmen, so wird man zweifellos die kugeligen Arten zu einer Gruppe zusammenfassen. Nur aus diesen praktischen Gesichtspunkten heraus werden die Tabellen 1 und 2 gebracht.

Einmal sind die sieben Arten in ihren Größen deutlich verschieden. Form, Größe und Lage des Augenfleckes sind auch sehr charakteristisch. Als systematisch „wichtige“ Merkmale haben zu gelten: Zellgröße, Membraneigenschaften, Augenfleckseigenschaften, Geißeleigenschaften, kontraktile Vakuolen, auch die Zellteilung ist hierher zu rechnen. Weniger „wichtig“ sind vorläufig die Lage des Zellkerns, Form und Größe der Stärkekörner, sowie andere Bildungen wie Palmellen, Akineten, Aplanosporen und Zygoten, weil diese nur selten zu beobachten sind.

Es soll jetzt noch auf einige Ähnlichkeiten zwischen den sieben *Polytoma*-Arten und *Chlamydomonas*-Arten hingewiesen werden. Kugelförmige *Chlamydomonas*-Arten sind in großer Zahl bekannt (PASCHER

Tabelle I. Die systematisch „wichtigen“ Eigenschaften der kugeligen *Polytoma*-Arten.

Art	Zellgröße	Membran	Membranpapille	Augenfleck	Kontr. Vakuolen	Geißeln	Teilung
1. <i>microsphaericum</i>	5—7 μ	dünn, anliegend	ohne	Mitte, Scheibe	2 vorn	2 mal dicht	2, ellipsoidisch
2. <i>tetraolare</i>	14—17 μ	dünn, abstehend	ohne	Mitte, Strich	4 vorn	2 mal dicht	2,4 ellipsoidisch
3. <i>pseudotetraolare</i>	8—11 μ	dünn, anliegend	ohne	ohne	4 vorn	1,5 mal dicht	2,4 ellipsoidisch
4. <i>palmelloides</i>	18—22 μ	derb, abstehend	ohne	vorn, Kugel	2 vorn	1 mal weit	4, kugelig
5. <i>macrospiraericum</i>	16—20 μ	dünn, anliegend	Kegelstumpf	vorn elliptisch	2 vorn	$\frac{3}{4}$ mal Papillenkante	4, kugelig
6. <i>uliginosum</i>	20—25 μ	dünn, anliegend	Kegelstumpf	ohne	2 vorn	1 mal seitlich Papille	4, kugelig
7. <i>oogamum</i>	25—30 μ	derb, anliegend	Kegelstumpf	Mitte, Strich	2 vorn	1 mal seitlich Papille	4,8 ellipsoidisch

Tabelle II. Die systematisch „weniger wichtigen“ Eigenschaften der kugeligen *Polytoma*-Arten.

Art	Plasmapapille	Zellkern	Stärkekörner	Palmellen, Ruhezustände	Sexualität	Sonstiges
1. <i>microsphaericum</i>	ohne	zentral	klein, kugelig	—	—	—
2. <i>tetraolare</i>	klein	vorne	groß, länglich	—	Isogamie Monözie	Planozygote Zygote 16 : 10 μ
3. <i>pseudotetraolare</i>	ohne	zentral	kugelig	—	Isogamie Monözie	Planozygote Zygote 10 μ
4. <i>palmelloides</i>	groß	zentral	kugelig	Palmellen	—	—
5. <i>macrospiraericum</i>	ohne	zentral	klein, kugelig	—	—	—
6. <i>uliginosum</i>	ohne	vorne	groß, kugelig	—	—	—
7. <i>oogamum</i>	ohne	zentral	kugelig	—	Oogamie Monözie	Zygote 25—30 μ

1927, 1930, PASCHER-JAHODA 1928, GERLOFF 1940). *P. microsphaericum* hat große Ähnlichkeit mit *Chlamydomonas microsphaerella* Pascher-Jahoda, bei der die Tochterzellen jedoch eiförmig sind und der Zellkern in der vorderen Zellhälfte liegt. Von WOLLENWEBER (in PASCHER 1927) ist eine *Chlamydomonas*-Art mit vier Vakuolen beschrieben worden, *Chl. tetraolare*, die mit *P. tetraolare* in dem Verlauf der geschlechtlichen Fortpflanzung sehr ähnlich ist. *Chlamydomonas*-Arten mit gallertigen Membranen wie bei *P. palmelloides* sind mehrere bekannt. Eine gewisse Ähnlichkeit hat *P. palmelloides* mit *Chlamydomonas mucosa* (Korschikoff) Pascher und mit *Chl. gloeosphaera* Pascher-Jahoda. *P. uliginosum* hat mit *Chlamydomonas Korschikoffia* Pascher einen gleichartigen Standort und im großen und ganzen sehr übereinstimmende Eigenschaften. Oogamie ist bei *Chlamydomonas* mehrfach bekannt. Die größte Ähnlichkeit besteht vielleicht zwischen *P. oogamum* und *Chlamydomonas cingulata* Pascher (= *Chl. monadina* Stein), die gleichfalls oogam ist.

Zusammenfassung.

Es werden auf Grund eigener Beobachtungen sieben *Polytoma*-Arten, die eine kugelige Gestalt haben, beschrieben. Fünf Arten sind neu. In zwei Tabellen werden die systematisch wichtigen und weniger wichtigen Eigenschaften zusammengestellt. An drei Arten konnte die geschlechtliche Fortpflanzung genauer verfolgt werden. Zwei Arten, *P. tetraolare* und *pseudotetraolare*, sind isogam und monözisch, sie bilden Planozygoten, eine Art ist oogam und monözisch. In der Größe, Form, Membran und Farbe der Zygoten unterscheiden sich die drei Arten deutlich. Von einer Art ist Palmellenbildung bekannt.

Literatur.

- CZURDA, V.: Beih. z. bot. Centralbl. **53**, A, 158 (1935).
 GERLOFF, J.: Arch. f. Protistenkunde **94**, 311 (1940).
 HARTMANN, M.: Sitzungsber. Preuß. Ak. Wiss. **20**, (1934).
 MOEWUS, F.: Zeitschr. f. ind. Abst. u. Vererbungsl. **69**, 374 (1935); Ber. D. Bot. Ges. **54**, (45) (1936); Zeitschr. f. ind. Abst. u. Vererbungsl. **73**, 63 (1937); Zeitschr. f. ind. Abst. u. Vererbungsl. **78**, 418 (1940).
 ONDRATSCHEK, K.: Beih. z. Bot. Centralbl. **61**, A, 277 (1941).
 PASCHER, A.: Süßwasserflora Heft 4: Volvocales (1927); Arch. f. Protistenkunde **69**, 103 (1930). — PASCHER, A. u. R. JAHODA: Arch. f. Protistenkunde **61**, 239 (1928). — PRINGSHEIM, E. G.: Arch. f. Protistenkunde **58**, 281 (1927).
 STREHLOW, K.: Zeitschr. f. Botanik **21**, 625 (1929).

(Aus der Reichsforschungsanstalt für Lebensmittelfrischhaltung, Karlsruhe,
und dem Institut für Pflanzenkrankheiten der Universität Bonn.)

Untersuchungen über den Kältetod von Mikroorganismen.

Von

BERND STILLE.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 1. November 1948.)

Die Lebenstätigkeit der Mikroorganismen in ihrer Gesamtheit — insbesondere aber zahlreicher Bakterienarten — ist innerhalb sehr weiter Temperaturgrenzen eingeschlossen. Die obere Grenze dieses Bereiches liegt bei etwa 70° C und wird durch mehrere thermophile Arten erreicht, während auf der anderen Seite nach den Feststellungen TSCHISTJAKOWS und seiner Mitarbeiter verschiedene *Bakterien*-, *Hefe*- und *Schimmelpilz*-Arten erst wesentlich unterhalb des Nullpunktes ihr Wachstum einstellen. So soll z. B. das Temperaturminimum für die Entwicklung von *Bact. fluorescens*, *Flavobact. flavescens* und einiger *Mikrokokken* bei —5° C und für *Flavobact. sulfureum*, *Bact. lactis viscosum*, *Penicillium glaucum*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium herbarum*, *Chaetostylum Fresenii* und *Thamnidium elegans* sogar bei —8° C liegen. Dabei ist durchaus unwesentlich, ob das Substrat gefroren ist: indessen befindet sich das Protoplasma der erwähnten Organismen sicherlich stets nur im unterkühlten Zustand.

Während durch ausreichendes Erhitzen mit Sicherheit völlige Sterilität erreicht wird, führen tiefe Temperaturen im allgemeinen nur eine mehr oder weniger starke Verminderung des ursprünglichen Keimgehaltes herbei, wie schon in älteren Arbeiten von PICTET, CHODAT und McFAYDEN ermittelt wurde. Diese Tatsache, daß ein gewisser Prozentsatz der Mikroorganismen dem Kälteeinfluß anheimfällt, während die übrigen lebensfähig bleiben, läßt sie über den engeren Rahmen der Mikrobiologie hinaus als Versuchsmaterial für allgemeine Untersuchungen über den Kältetod der Zelle als besonders geeignet erscheinen, und es sei hier nur auf folgende Punkte hingewiesen:

1. Bei den Mikroorganismen finden sich alle möglichen Resistenzunterschiede, die der Frage nach dem Mechanismus des Kältetodes zahlreiche Ansatzpunkte bieten;

2. Der Anteil der überlebenden und der abgestorbenen Zellen läßt sich statistisch zuverlässig durch Plattenkultur nach dem Verdünnungsverfahren ermitteln;

3. Während die Zellen höherer Organismen stets in einer Korrelation zueinander stehen und der Tod oder die Schädigung einzelner

Zellen auch die Nachbarschaft in Mitleidenschaft zieht, reagieren die Einzeller innerhalb einer Aufschwemmung weitgehend unabhängig voneinander;

4. Das Milieu, in dem sich die Mikroorganismen während des Einfrierens befinden, läßt sich in beliebiger Weise modifizieren (durch Änderung der Wasserstoffionenkonzentration, des osmotischen Wertes, des Kolloidgehaltes und durch Zugabe bestimmter Kationen und Anionen) und dadurch der Einfluß der verschiedenartigsten Umweltfaktoren, die die schädigende Wirkung der Kälte bzw. des Auftauens auf die Zelle unterstützen oder abschwächen, ermitteln. Im Gegensatz dazu sind die Zellen höherer Organismen, da sie sich innerhalb eines Zellverbandes befinden, derartigen Umwelteinflüssen wesentlich schwerer zugänglich.

Die Frage nach der Natur des Kältetodes berührt eines der interessantesten, aber auch der umstrittensten Probleme der Protoplasmaforschung. Seit mehr als hundert Jahren ist dieses Gebiet Gegenstand zahlreicher Untersuchungen gewesen; dabei wurden die verschiedensten — sich teils ergänzenden, teils widersprechenden — Theorien über den Kältetod entwickelt, deren wesentlichste hier in kurzen Zügen umrissen werden sollen (ausführliche Literaturangaben finden sich in der Protoplasma-Monographie von BĚLEHRÁDEK):

1. Die älteste Meinung, die auch von DU HAMEL (1758) und von SENNEIER (1800) geäußert wurde, war, daß die Zellen durch die beim Gefrieren des Wassers eintretende Ausdehnung mechanisch zum Zerplatzen gebracht würden. Sie wurde jedoch bereits 1830 aufgegeben, als GÖPPERT nachweisen konnte, daß die Pflanzenzellen nach dem Gefrieren keine derartigen Schäden aufweisen.

2. SACHS und HOPPE-SEYLER nahmen auf Grund von Untersuchungen an pflanzlichen und tierischen Geweben an, daß die Eisbildung in den Zellen nicht so sehr entscheidend sei, daß aber das Protoplasma während des Auftauens durch das ausgefrorene Wasser überschwemmt und dadurch geschädigt würde, wobei langsames Auftauen die Zelle vor dem Tode retten könne. Dieser Theorie schlossen sich in neuerer Zeit insbesondere ÅKERMAN und ILJIN an, und auch KESSLER und RUHLAND sind wesentliche Beiträge und Ergänzungen zu dieser Auffassung zu verdanken.

3. Innerhalb und außerhalb der Zelle tritt Eisbildung ein, so daß der Zellinhalt entweder durch die Kristallbildung mechanisch oder aber durch Kältekoagulation der Plasmakolloide physiko-chemisch zerstört wird (SACHS, MOLISCH, LOTTERMOSER und STILES.)

4. Beim Gefrieren wird der Zelle Wasser entzogen (MÜLLER-THURGAU, 1880), dadurch steigt die Konzentration der im Protoplasma gelösten Stoffe derart, daß sie eine Giftwirkung ausüben und das kolloidale Gleichgewicht des Protoplasmas stören (GORKE, FISCHER und HARVEY; ferner WIEGAND, KYLIN, SCHANDER und SCHAFFNIT).

5. Nach MAXIMOV, LEPESCHKIN und RAHM bewirken die beim Gefrieren außerhalb der Zelle sich bildenden Eiskristalle durch mechanischen Druck von außen her die Koagulation und Denaturierung der Plasmakolloide.

6. Nach Ansicht von MEZ soll der Kältetod ohne Eisbildung bei Unterschreiten bestimmter spezifischer Temperaturminima eintreten; die Eis-

bildung soll sogar gegebenenfalls eine Schutzwirkung ausüben, da sie die Wärmeleitfähigkeit vermindert und dadurch eine zu rasche Unterkühlung der Gewebe verhindert. Dieser Vorstellung schlossen sich auch BARTEZKA und RAHM auf Grund von Untersuchungen an Schimmelpilzen und Insekten an.

Die Gegensätze zwischen den verschiedenen Auffassungen dürften sich z. T. aus der Tatsache erklären lassen, daß einerseits von den einzelnen Autoren ganz verschiedene Organismen bzw. deren Teile zu den Untersuchungen herangezogen wurden, und sicherlich dürfte der Kältetod bei der Vielzahl der untersuchten Objekte nicht in jedem Einzelfall durch die gleiche Schädigungsart herbeigeführt werden. Andererseits ist ferner zu bedenken, daß jene morphologisch feststellbaren Veränderungen, die den getöteten Organismus kennzeichnen, durchaus sekundärer Art sein können und lediglich das Endglied einer Reaktionskette darstellen, die erst nach Eintritt eines primär tödlichen, aber der Beobachtung entzogenen Ereignisses eingeleitet wird. So ist es denn auch verständlich, daß diese Schwierigkeiten einer subjektiven Deutung besonders weiten Spielraum lassen.

Die folgenden Untersuchungen über den Kältetod beschränken sich aus den bereits früher erwähnten Gründen ausschließlich auf Mikroorganismen. Sie sollen in erster Linie eine Sammlung von Tatsachenmaterial darstellen. Darüber hinaus sind die Kenntnisse, die wir über das Verhalten von Einzellern gegenüber schädigenden Einflüssen gewinnen, auch für die Beurteilung jener Vorgänge von Bedeutung, die sich an höher differenzierten, aber experimentell schwerer zugänglichen Organismen abspielen.

I. Material und Methode.

Bei der Auswahl geeigneter Versuchsorganismen mußten zunächst verschiedene Gesichtspunkte berücksichtigt werden.

So wurden alle sporenbildenden Arten von den Untersuchungen ausgeschlossen; denn die Sporen widerstehen durchweg dem Kälteeinfluß. Da nun der Anteil versporter und vegetativer Zellen innerhalb einer Kultur schwankend und zahlenmäßig nur schwer nachweisbar ist, gestatten Befunde an sporenhaltigem Material keine sicheren Rückschlüsse auf die Kälteresistenz der vegetativen Stadien der betreffenden Arten.

Um ferner eine zuverlässige statistische Auswertung der Tötungsexperimente zu gewährleisten, konnten nur solche Organismen zu den Versuchen herangezogen werden, die sich innerhalb einer Aufschwemmung mit Sicherheit in einzelne Individuen trennen lassen. Die Zellverbände mancher Bakterienarten — insbesondere der *Coccaceen* — werden nämlich erst durch die beim Gefrieren eintretende Eisbildung teilweise auseinander gesprengt, infolgedessen kann dann bei der Bestimmung der Keimzahl sogar eine Vermehrung vorgetäuscht werden.

Außerdem beschränkte sich die Auswahl nur auf solche Arten, die keine besonderen Ansprüche hinsichtlich ihrer Kultur stellen und die auf festen Nährboden gleichmäßige und leicht zählbare Kolonien bilden (u. a. *Pseudomonas pyocyanea*, *Ps. fluorescens*, *Bacterium prodigiosum*, *Bact. rubidum*, *Bact. tenellum*, *Saccharomyces cerevisiae*).

Die Kultur der Bakterienarten erfolgte im allgemeinen auf Dextroseagar¹ und auf mineralischem Nährboden nach GOTTHEIL², während die Hefe auf Würzeagar gezüchtet wurde.

Die Bruttemperatur betrug 20 bis 30° C. Zum Einfrieren wurden stets junge, höchstens zwei Tage alte Kulturen verwendet. Im übrigen wurden die methodischen Einzelheiten bei den verschiedenen Versuchsreihen in mehrfacher Hinsicht variiert, um den Einfluß zusätzlicher Faktoren auf den Absterbeverlauf der Mikroorganismen zu ermitteln. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sollen deshalb die betreffenden Angaben über abgeänderte Versuchsbedingungen stets den späteren Einzelabschnitten dieser Arbeit vorbehalten bleiben und an dieser Stelle nur der allgemeine Arbeitsgang umrissen werden.

Aus den Kulturen wurde mittels einer Platinöse stets eine bestimmte Probemenge entnommen und in die sterile Aufschwemmungsflüssigkeit (z. B. physiologische Kochsalzlösung) übertragen, die anschließend mindestens 10 Minuten lang kräftig geschüttelt wurde, um eine Trennung und möglichst gleichmäßige Verteilung aller Keime zu bewirken.

Zum Einfrieren wurden entweder je 10 ccm der Aufschwemmung auf eine größere Serie von Reagensgläsern gleicher Größe übertragen oder aber die der Bestimmung dienende Flüssigkeitsmenge direkt in sterile Petrischalen hineinpipettiert. Dabei wurde gelegentlich der durch Erwärmen verflüssigte Nährboden bereits vor dem Gefrieren zugegeben, insbesondere bei der sehr kälteempfindlichen *Pseudomonas pyocyanea*. Innerhalb jeder einzelnen Versuchsreihe herrschten selbstverständlich stets konstante Bedingungen.

Die Gefriertemperatur betrug im allgemeinen — 24° C. Dabei wurde die Geschwindigkeit des Einfrierens durch Anblasen der Versuchsgläser mit kalter Luft (Apparat nach HECKERMAN) wesentlich beschleunigt. Jedoch wurde gelegentlich zu Vergleichszwecken durch Eintauchen der Röhrchen in ein Dewargefäß mit flüssiger Luft (— 193° C) eingefroren.

Das Auftauen erfolgte normalerweise bei etwa + 25° C; bei den Reagensgläsern im temperierten Wasserbad, bei den Petrischalen durch die umgebende Luft. Wegen der geringen Flüssigkeitsmengen ließen sich Einfrieren und Auftauen bequem innerhalb zweier Stunden durchführen. Um den Organismen im aufgetauten Zustande keine das Ergebnis störende Entwicklungsmöglichkeit zu lassen, wurde sofort nach dem Auftauen mit den Keimzahlbestimmungen begonnen (Kochsches Plattenverfahren). Um den Einfluß zahlenmäßiger Streuungen auf die Ergebnisse möglichst einzuschränken, wurden für jede einzelne Ermittlung stets drei Parallelplatten angelegt und aus der Zahl der Kolonien Mittelwerte errechnet. Dabei ist es selbstverständlich und durch die Methodik des Plattenverfahrens bedingt, daß nur solche Zellen als „überlebend“ bezeichnet wurden, die sich nach Zugabe des Nährbodens als vermehrungsfähig erwiesen und zur Ausbildung von Kolonien führten. Die Bezeichnung „abgetötet“ ist also mit einer gewissen Einschränkung zu verstehen, und man könnte vorsichtshalber auch

¹ Dextroseagar: Pepton-Witte 1,2 g, Liebig's Fleischextrakt 0,8 g, NaCl 0,2 g, Dextrose 1,0 g, Agar 1,6 g, Aqua dest. ad 100,0 ccm, lackmusneutral.

² Mineralischer Nährboden: Pepton-Witte 10,0 g und Agar 15,0 g zu 1000,0 ccm mineralische Nährlösung. Zusammensetzung derselben: 10,0 ccm 10%ige K_2HPO_4 , 30,0 ccm 1%ige $MgSO_4$, 10,0 ccm 1%ige NaCl, 1,0 ccm 1%ige Fe_2Cl_6 , 949 ccm Aqua dest., neutrale Reaktion [nach GOTTHEIL, Cbl. Bakt., II, 7, 432 (1901)].

von einem Erlöschen der Wachstums- und Vermehrungsfähigkeit der Zellen sprechen. Da den Mikroorganismen jedoch in jedem Falle die gleichen Kulturbedingungen geboten wurden, kann diese Frage in diesem Zusammenhang vernachlässigt werden.

Da die Keimzahlermittlungen nach dem Plattenverfahren bei den umfangreichen Versuchsreihen einen erheblichen Material- und Arbeitsaufwand erfordern, wurde zunächst vergleichsweise auch die Methylenblaufärbemethode zum direkten mikroskopischen Nachweis der überlebenden Zellen herangezogen. Die Methode, derer sich auch in neueren Arbeiten insbesondere A. und S. GOETZ und W. LEPESCHKIN bedienen, besteht darin, daß tote Zellen in $1/500$ wäßriger Methylenblaulösung spontan eine intensive Blaufärbung annehmen, während die lebenden Protoplasten ungefärbt bleiben sollen. In den eigenen Versuchen konnte jedoch festgestellt werden, daß das Methylenblau in der erwähnten Konzentration eine deutliche Giftwirkung auf die Mikroorganismen ausübt und beispielsweise bei *Saccharomyces cerevisiae* bereits nach einer Einwirkungsdauer von 10 Minuten 32% und nach 20 Minuten 58% der anfangs vorhandenen Zellen abtötet. Aus diesem Grunde mußte bei der Keimzahlermittlung dem Plattenverfahren der Vorzug gegeben werden³.

II. Ergebnisse.

1. Der Einfluß einmaligen Gefrierens.

a) Kälteempfindlichkeit verschiedener Mikroorganismenarten.

Den Ausgangspunkt der Untersuchungen bildeten Versuche, in denen zunächst die Kälteempfindlichkeit mehrerer nichtsporenbildender Mikroorganismenarten ermittelt werden sollte. Es kam hierbei weniger darauf an, die altbekannte Tatsache unterschiedlicher Kälteresistenz der Mikroben nochmals zu beweisen, als vielmehr für die weiteren speziellen Versuche besonders geeignete Organismen ausfindig zu machen und Vergleichswerte für die späteren Befunde zu gewinnen.

Im einzelnen wurden Aufschwemmungen in physiologischer Kochsalzlösung 30 Stunden alter Kulturen von *Saccharomyces cerevisiae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Ps. pyocyanea*, *Bacterium prodigiosum*, *Bact. rubidaeum*, *Bact. tenellum*, *Bact. odiosum* in Reagensgläsern zu je 10 ccm bei -24° C eingefroren und im Anschluß daran sofort wieder aufgetaut. Dabei ergaben sich die in Tab. I wiedergegebenen Abnahmen des ursprünglichen Keimgehaltes.

³) Die von S. STRUGGER 1942 bekanntgegebene fluoreszenzmikroskopische Unterscheidung lebender und toter Bakterienzellen mit Hilfe der Akridinorangefärbung wurde experimentell nicht berücksichtigt, da die vorliegenden Untersuchungen bereits 1940 begonnen waren und es unzweckmäßig erschien, nach längeren eindeutigen Versuchsreihen noch einen Wechsel in der Methodik vorzunehmen und ein Verfahren heranzuziehen, dessen Brauchbarkeit und Grenzen seinerzeit noch zur Diskussion standen.

Tabelle I. *Abnahme der Keimzahl.*

Es bedeuten: A = Keimzahl je 1 ccm Aufschwemmung vor dem Gefrieren,
B = Keimzahl je 1 ccm Aufschwemmung nach dem Gefrieren und Auftauen.

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>			
A	B	% Abnahme	
3760	2395	36,3	10 ³ Keime je 1 ccm Aufschwemmung
12430	8762	29,8	
277	194	30,0	
6435	4789	25,6	
683	527	22,9	
712	440	38,2	
1378	962	28,7	
3260	2443	22,5	
899	632	29,7	
571	377	34,0	
659	494	24,6	
2175	1705	21,6	
717	482	32,8	
1827	1244	31,9	
			Mittlere Abnahme der Keimzahl: 29,2%

<i>Pseudomonas fluorescens</i>			<i>Pseudomonas pyocyanea</i>		
10 ³ Keime je 1 ccm Aufschwemmung					
A	B	% Abnahme	A	B	% Abnahme
1280	964	24,7	5690	114	98,0
3740	2820	26,4	13600	1032	92,4
853	587	31,2	894	35	96,1
2170	1570	27,8	7970	813	89,8
527	410	22,3	4310	121	97,2
818	574	29,8	2510	306	87,8
1110	717	35,4	32600	2050	93,7
12800	9140	28,6	18300	714	96,1
2460	1570	36,1	9540	1360	85,6
6850	5500	19,7	1840	15	99,2
Mittlere Abnahme:		28,2%	Mittlere Abnahme:		93,6%

<i>Bacterium prodigiosum</i>			<i>Bacterium rubidaeum</i>		
10 ³ Keime je 1 ccm Aufschwemmung					
A	B	% Abnahme	A	B	% Abnahme
3840	830	78,4	34500	6210	82,0
8270	1110	86,3	6450	1593	75,3
16400	2900	81,3	539	61	88,6
6140	1850	69,8	7850	1020	87,0
27500	5300	77,3	3218	705	78,1
886	137	84,5	924	144	84,4
2380	350	85,3	1287	221	82,8
7260	1270	82,5	4610	904	80,4
615	117	81,0	2100	569	72,9
2130	341	72,3	868	109	87,4
Mittlere Abnahme: 79,9%			Mittlere Abnahme: 81,9%		

Tabelle I. (Fortsetzung.)

<i>Bacterium tenellum</i>			<i>Bacterium odiosum</i>		
10 ³ Keime je 1 ccm Aufschwemmung					
A	B	% Abnahme	A	B	% Abnahme
3760	703	81,3	8350	267	96,8
8280	2450	70,4	24200	2370	90,2
948	231	75,6	7820	1350	82,7
12400	4240	65,8	13600	816	94,0
9600	3390	64,7	6830	383	94,4
5830	1545	73,5	3780	272	92,8
6760	1480	78,1			
882	289	67,2			
26500	9170	65,4			
7580	1645	78,3			
Mittlere Abnahme:		72,0 %	Mittlere Abnahme:		91,8 %

Die obigen Ergebnisse lassen erkennen, daß alle untersuchten Mikroorganismen auf das Einfrieren mit einer deutlichen Verminderung der Keimzahl reagieren, daß aber bei keiner der erwähnten Arten durch den Gefriervorgang eine restlose Sterilisation herbeigeführt wird. Bemerkenswert ist der beträchtliche Resistenzunterschied zwischen dem nahverwandten *Pseudomonas fluorescens* und *Ps. pyocyanea*, die mit einer Absterbequote von 28,2 bzw. 93,6 % gleichzeitig die resistantesten und empfindlichsten der untersuchten Arten sind. Außerordentlich gering ist dagegen der Unterschied zwischen *Bacterium prodigiosum* und *Bact. rubidaeum*, deren Absterbequoten von 79,9 und 81,9 % innerhalb der Fehlergrenze praktisch übereinstimmen. *Bacterium rubidaeum*, das von STAPP als nova species beschrieben und ausdrücklich *Bacterium prodigiosum* gegenübergestellt wurde, weicht also hinsichtlich seiner Kälteempfindlichkeit nicht von dem letztgenannten ab.

Es ist jedoch einleuchtend, daß die in den Tabellen wiedergegebenen Werte auf keinen Fall als konstant zu betrachten sind: Sie stellen vielmehr nur eine relative Empfindlichkeitsskala der einzelnen Arten dar und können daher nur für die oben beschriebenen Versuchsbedingungen Gültigkeit haben. Es war daher naheliegend, durch planmäßige Änderung einzelner Faktoren zu ermitteln, inwieweit die Zahl der beim Gefrieren absterbenden Zellen von besonderen äußeren Einflüssen abhängig ist.

b) Einfluß der Gefriertemperatur und der Gefriergeschwindigkeit.

Zunächst wurde vermutet, daß möglicherweise die Gefriertemperatur von besonderer Bedeutung sei und die Absterbequote wesentlich beeinflussen würde. Es wurden daher Aufschwemmungen von *Saccharomyces cerevisiae* und *Bacterium prodigiosum* — ebenfalls je 10 ccm in

Reagensgläsern — durch Eintauchen in ein Dewargefäß mit flüssiger Luft, bei -193°C , eingefroren. Es wurden folgende Abnahmen festgestellt (Tab. II):

Tabelle II. *Abnahme der Keimzahl.*

10^3 Keime je 1 ccm Aufschwemmung

A = vor, B = nach Einfrieren bei -193°C und Auftauen

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>			<i>Bacterium prodigiosum</i>		
A	B	% Abnahme	A	B	% Abnahme
2440	1890	22,6	2450	999	59,2
5650	4450	21,3	2160	918	57,5
985	922	16,5	6480	3350	48,3
1730	1470	14,8	967	449	53,6
1630	1240	24,1	1680	667	60,3
3180	2570	19,2	4250	2130	49,8
838	723	13,7	3150	1420	54,9
5560	4330	22,2	767	302	60,6
1270	1110	12,6	3520	1440	59,1
942	782	17,0	1340	659	50,8

Mittlere Abnahme: **18,4 %**

Mittlere Abnahme: **56,4 %**

Vergleicht man diese Werte mit den früheren Befunden, so läßt sich eine eindeutig verminderte Absterbequote feststellen. So betrug die mittlere Abnahme der Keimzahl von *Saccharomyces cerevisiae* bei -24°C 29,2 %, während bei -193°C nur 18,4 % der ursprünglich vorhandenen Zellen abstarben. Bei *Bacterium prodigiosum* gingen bei -24°C 79,9 % und bei -193°C 56,4 % zugrunde.

Zweifelloos ist dieses überraschende Ergebnis ausschließlich auf die größere *Gefriereschwindigkeit* zurückzuführen, mit der der für die Mikroorganismen schädliche Temperaturbereich durchheilt wird.

Es ließe sich einwenden, daß die obigen Werte dennoch keinen genügend sicheren Aufschluß über den Anteil der *Gefriereschwindigkeit* und der *Gefriertemperatur* an der Absterbequote vermitteln. Es wäre nämlich durchaus vorstellbar, daß bei entsprechender Gefriereschwindigkeit möglicherweise zunächst nur eine ganz geringfügige Verringerung der Keimzahl herbeigeführt wird, daß dann aber die sehr tiefen Temperaturen zusätzlich eine schädigende Wirkung ausüben und die oben mitgeteilten Abnahmen bewirken.

Um diese Frage zu klären wurde in einem weiteren Versuch stufenweise eingefroren, und zwar zunächst bei -24°C und im Anschluß daran bei -193°C . Die Organismen waren damit sowohl dem Einfluß des langsameren Gefrierens als auch der sehr tiefen Temperatur ausgesetzt, so daß im Falle einer besonderen Schädigung durch die tiefen Temperaturen unbedingt eine größere Absterbequote als beim einfachen Gefrieren bei -24°C zu erwarten gewesen wäre (Tab. III).

Tabelle III. *Abnahme der Keimzahl.*10³ Keime je 1 ccm AufschwemmungA = vor, B = nach Einfrieren bei -24°C , daran anschließendem Tiefgefrieren bei -193°C und Auftauen.

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>			<i>Bacterium prodigiosum</i>		
A	B	% Abnahme	A	B	% Abnahme
3210	2320	27,7	3630	842	76,8
1740	1140	34,3	1890	316	83,3
2310	1640	29,1	2740	345	87,4
1350	992	26,5	5130	1390	72,9
4080	2710	33,6	987	148	84,7
Mittlere Abnahme:		30,2%	Mittlere Abnahme:		81,0%

Diese Absterbequoten decken sich also wiederum mit den Werten, die bereits beim Einfrieren bei -24°C ermittelt wurden. Die weitere Senkung der Temperatur auf -193°C ist demnach für die untersuchten Mikroorganismen völlig bedeutungslos und führt keine besondere Schädigung herbei. Es ergibt sich somit, daß der kritische Temperaturbereich bei -24°C bereits durchlaufen ist und daß die Absterbequote wesentlich von der Geschwindigkeit abhängig ist, mit der dieser Bereich durchheilt wird.

c) Einfluß der Geschwindigkeit des Auftauens.

Nach den 1860 von SACHS mitgeteilten „Untersuchungen über das Erfrieren der Pflanzen“ soll der Kältetod durch zwei verschiedene Ursachen herbeigeführt werden können, nämlich „Beschädigung und Tötung auf mechanische Art ... durch die Ausdehnung des Eises im Moment seines Erstarrens“ und „Tötung oder lokale Zerstörung der Pflanzensubstanz durch das Auftauen, nachdem sie gefroren war“. Gerade dieser letztgenannten Schädigungsart schrieb SACHS die größere Bedeutung zu, vor allem auf Grund der Feststellung, daß durch ein schnelles Auftauen der Tod der Zellen in manchen Fällen eintrat, während ein langsames Auftauen vor dem Tode schützte. Den Grund dafür erblickte er in einer nach dem Gefrieren und Auftauen gesteigerten Permeabilität der Zellwände, sie „erlaubt es den verschiedenen Inhaltsstoffen sich zu mengen, und so werden chemische Prozesse herbeigeführt, welche eine Zersetzung der Gewebestoffe erzeugen können“.

In neuerer Zeit hat vor allem LILLY durch wesentliche Kriterien diese Auffassung ergänzt und erweitert. Danach wird der Zelle beim Gefrieren nicht nur das „freie“ Wasser, sondern auch das an die Plasmakolloide gebundene Hydratationswasser entrissen und auskristallisiert. Falls nicht schon dieser Vorgang tödlich wirkt, dann verbleibt noch als besondere Gefahr der Wassereinbruch während des Wiederauftauens. Erfolgt dieser Vorgang rasch, so wird das Plasma mit Wasser überschwemmt und dessen Feinstruktur zerstört; bei langsamem Verlauf können die Kolloide jedoch wieder die ursprüngliche Wasserverbindung eingehen, so daß mizellare Ver-

lagerungen und Zerstörungen vermieden werden. So ließ sich z. B. nachweisen, daß die Zellen vom Rotkohl, der an und für sich nicht durch besondere Kälteresistenz ausgezeichnet ist, selbst nach Einfrieren bei -80°C noch am Leben blieben, wenn der Auftauvorgang schonend und während einer längeren Zeitdauer erfolgte. Auch die Befunde von KESSLER und RUHLAND decken sich mit dieser Auffassung.

Es war daher naheliegend, auch bei den Mikroorganismen ähnliche Versuche anzustellen, um den Einfluß der Auftaugeschwindigkeit auf die Absterbequote zu ermitteln.

Wie bereits eingangs erwähnt, erfolgte das Auftauen der eingefrorenen Aufschwemmungen im allgemeinen durch Eintauchen der Reagensgläser in ein temperiertes Wasserbad von 25°C , um die Mikroorganismen in den verschiedenen Versuchen durchweg den gleichen Auftaubedingungen auszusetzen. Dabei schmolzen die geringen Eis-mengen in kürzester Zeit.

In der nun folgenden Versuchsreihe wurde jedoch von diesen Bedingungen abgewichen und die Aufschwemmungen, nachdem sie zunächst bei -24°C eingefroren waren, anschließend in einen Kühlraum, dessen Temperatur $+0,5^{\circ}\text{C}$ betrug, übertragen. Dort verblieben sie bis zum restlosen Auftauen, was etwa 5 bis 6 Stunden in Anspruch nahm. Darauf erfolgten die Keimzahlbestimmungen (Tab. IV).

Tabelle IV. Abnahme der Keimzahl.

10³ Keime je 1 ccm Aufschwemmung
A = vor, B = nach Einfrieren bei -24°C und langsamem Auftauen.

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>			Mittlere Abnahme der Keimzahl: 23,4 %
A	B	% Abnahme	
1420	1070	24,8	
2590	2090	19,6	
845	689	18,5	
772	561	27,3	
2120	1640	22,8	
3240	2390	26,3	

<i>Pseudomonas fluorescens</i>			<i>Pseudomonas pyocyanea</i>		
A	B	% Abnahme	A	B	% Abnahme
2740	2250	17,9	2460	197	92,0
1180	993	20,4	6200	1170	81,1
2220	1790	19,2	3810	366	90,4
790	572	27,6	973	138	85,8
4530	3440	24,0	1780	286	83,9
1830	1380	24,4	2330	161	93,2
Mittlere Abnahme:		22,7 %	Mittlere Abnahme:		87,7 %

Tabelle IV. (Fortsetzung.)

<i>Bacterium prodigiosum</i>			<i>Bacterium rubidaeum</i>		
A	B	% Abnahme	A	B	% Abnahme
2740	1140	58,3	5240	1830	65,1
6310	2090	66,9	1460	629	56,9
12100	3636	70,0	2170	532	75,5
8500	2480	55,8	846	259	69,4
987	370	62,5	720	333	53,7
724	237	67,3	3120	992	68,2
Mittlere Abnahme: 63,4%			Mittlere Abnahme: 64,8%		

Stellt man diese Werte den Befunden gegenüber, die beim raschen Auftauen der Aufschwemmungen im Wasserbade bei einer Temperatur von $+25^{\circ}\text{C}$ ermittelt wurden (s. S. 559/560), so ergeben sich folgende Unterschiede:

	Auftauen rasch	Auftauen langsam
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	29,2	23,4
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	28,2	22,7
<i>Pseudomonas pyocyanea</i>	93,6	87,7
<i>Bacterium prodigiosum</i>	79,9	63,4
<i>Bacterium rubidaeum</i>	81,9	64,8

Durch die Verminderung der Auftaugeschwindigkeit konnte also die Absterbequote bei allen untersuchten Mikroorganismenarten merklich herabgesetzt werden.

In einem weiteren Versuch sollte schließlich noch der Einfluß der extremen Bedingungen, nämlich *rasches* Einfrieren und *langsames* Auftauen, erfaßt werden. Zu diesem Zweck wurden Aufschwemmungen der *Hefe* zunächst in flüssiger Luft bei -193°C eingefroren und daran anschließend im Kühlraum bei $+0,5^{\circ}\text{C}$ langsam aufgetaut. Dabei konnten folgende Abnahmen ermittelt werden (Tab. V):

Tabelle V. *Abnahme der Keimzahl.*

10³ Keime je 1 ccm Aufschwemmung. A — vor dem Gefrieren, B — nach Einfrieren bei -193°C und langsamem Auftauen.

A	B	% Abnahme	
2320	1940	16,3	Mittlere Abnahme der Keimzahl: 14,4%
3420	3020	11,8	
988	819	17,1	
1730	1440	16,4	
872	778	10,8	
1480	1270	14,4	

Stellt man nun die unter den beschriebenen Versuchsbedingungen gewonnenen bisherigen Befunde über das Absterben der *Hefe* bei langsamem und raschem Gefrieren und Auftauen gegenüber, so ergibt sich folgendes Bild:

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
Gefrieren:	Auftauen:	% Abnahme
langsam	rasch	29,2
langsam	langsam	23,4
rasch	rasch	18,4
rasch	langsam	14,5

Das Absterben der Hefezellen kann also sowohl während des Gefrierens als auch während des Auftauvorganges eintreten. Dabei wirkt rasches Einfrieren und langsames Auftauen deutlich schonender als langsames Einfrieren und rasches Auftauen. Das gleiche gilt auch für alle übrigen untersuchten Mikroorganismenarten.

2. Der Einfluß äußerer Bedingungen auf die Kälteempfindlichkeit.

a) Wasserstoffionenkonzentration.

Die obigen Absterbequoten gelten, wie bereits erwähnt, nur für das Einfrieren der Mikroorganismen in physiologischer Kochsalzlösung und lassen sich infolgedessen nicht verallgemeinern und nur unter den gleichen Versuchsbedingungen reproduzieren. Setzt man nämlich der Aufschwemmung, in der eingefroren werden soll, bestimmte Substanzen, die an und für sich völlig harmlos sind und die normalerweise die *Lebensfähigkeit* der Mikroorganismen durchaus nicht beeinträchtigen, in geringer Menge zu, so kann der Prozentsatz der Zellen, die während des Einfrierens absterben, erheblich beeinträchtigt werden.

Im folgenden soll zunächst über die Wirkung der Wasserstoffionenkonzentration berichtet werden.

Besondere Beachtung verdient in diesem Zusammenhang die frühere Feststellung von BIGELOW und ESTY, daß auch bei der Hitzesterilisation die H-Ionenkonzentration des Milieus bedeutungsvoll ist und zunehmende Azidität die erforderliche Sterilisationszeit für Aufschwemmungen von Bakteriensporen erheblich verkürzt. Gleichsinnige Ergebnisse ermittelte COHEN für die Hitzeabtötung von *Bacterium coli* und *Bact. typhi* in angesäuertem Wasser.

Auch das Absterben der Hefe beim Austrocknen hängt nach den Feststellungen LEPESCHKINS in hohem Grade von der Reaktion der Umgebung ab.

Die Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration für die Kälteresistenz der Zellen verschiedener Gewebearten einer und derselben Pflanze konnte ZACHAROWA klären, die als Versuchsobjekt die Wurzel des Buchweizens wählte. Am kälteresistentesten erwies sich die meristematische Zone der

Wurzel, deren Zellsaftreaktion in allen Fällen alkalisch ist, während die Zellen der Rinde und der Wurzelhaare, deren Saft saure Reaktion aufweist, die geringste Resistenz gegenüber der Kälte zeigten. Eine Zwischenstellung bezüglich der Kälteempfindlichkeit ergab sich für den Zentralzylinder, der neutrale Reaktion des Zellsaftes aufweist. In weiteren Versuchen an Rotkohlschnitten konnte nachgewiesen werden, daß selbst eine sehr schwache Ansäuerung eine bedeutende Verminderung der Kälteresistenz der Zellen hervorruft, während geringfügige Alkalität im umgekehrten Sinne wirksam ist.

Eine gesteigerte Empfindlichkeit der Mikroorganismen gegenüber dem Einfrieren in sauren Lösungen beweisen die Versuche von BROADHURST und GILPIN, die die Abnahme des Keimgehaltes bei der Herstellung verschiedener saurer Speiseeisarten verfolgten. Im sauren Zitronen- und Orangeneis (pH bis 3,2) trat stets ein beträchtlicher, im schwach alkalischen Vanilleeis (pH etwa 7,8) dagegen nur ein geringfügiger Rückgang des ursprünglichen Keimgehaltes ein. Auch WALLACE und TANNER und McFARLANE ermittelten eine erhöhte Schädigung der Mikroorganismen beim Einfrieren in sauren Medien.

Die folgenden Versuchsreihen beleuchten das Verhalten von *Saccharomyces cerevisiae* in Aufschwemmungen mit planmäßig abgestufter H-Ionenkonzentration. Es wurden Puffergemische verschiedener Azidität aus Standardlösungen von $\frac{1}{15}$ mol. primärem Kaliumphosphat und von $\frac{1}{15}$ mol. sekundärem Natriumphosphat (nach SÖRENSEN) hergestellt und zu je 100 ccm auf eine Serie von Schüttelflaschen verteilt. Anschließend wurden je 0,5 ccm einer Aufschwemmung von *Sacch. cerevisiae* in die Flaschen übertragen und der Inhalt nach ausgiebigem Schütteln zu je 10 ccm auf sterile Reagensgläser verteilt. Nach zweistündigem Verweilen bei Zimmertemperatur erfolgte die Bestimmung des Anfangskeimgehaltes. Die übrigen Gläser wurden bei -24°C eingefroren und dann nach zwei bis drei Stunden bei Zimmertemperatur aufgetaut, um die Abnahme der Keimzahl zu ermitteln (Tab. VI).

Tabelle VI. *Abnahme der Keimzahl.*

Saccharomyces cerevisiae, 10^3 Keime je 1 ccm Aufschwemmung, A = vor, B = nach Gefrieren und Auftauen in Pufferlösungen.

Reihe	pH	A	B	% Abnahme	Mittelwert %
1	4,5	1290	292	77,3	77,6
2		482	54	88,8	
3		2740	1070	62,7	
4		3940	725	81,6	
1	5,9	1040	529	48,1	49,5
2		502	225	55,0	
3		2950	1340	44,6	
4		4860	2420	50,2	
1	7,0	1420	1050	26,2	32,4
2		468	291	37,9	
3		2340	1680	28,4	
4		4170	2630	37,0	

Tabelle VI. (Fortsetzung.)

Reihe	p _H	A	B	% Abnahme	Mittelwert %
1	9,2	1560	1210	22,5	23,6
2		603	442	26,7	
3		2420	1910	20,9	
4		4650	3520	24,3	

Die Resistenz der Hefe gegenüber dem Gefrieren wird demnach in sehr hohem Grade durch die H-Ionenkonzentration ihrer Umgebung bestimmt. Innerhalb des untersuchten p_H-Bereiches liegen die Absterbequoten um mehr als das Dreifache auseinander (Abnahme bei p_H 9,2 23,6 % und bei p_H 4,5 77,6 %). Obgleich die Hefe für ihre Entwicklung ein saures Substrat bevorzugt, geht dennoch die beim Gefrieren eintretende Störung der Zelle bei saurer Reaktion wesentlich leichter vor sich als im neutralen oder alkalischen Bereich.

Ähnliche Versuche an verschiedenen Bakterienarten ergaben ebenfalls beträchtlich erhöhte Absterbequoten beim Gefrieren im sauren Milieu. Die folgende Tabelle VII zeigt das Verhalten von *Bacterium prodigiosum*, *Pseudomonas pyocyanea* und *Ps. fluorescens* beim Einfrieren in Phosphatpufferlösungen von p_H 4,5 und p_H 9,2.

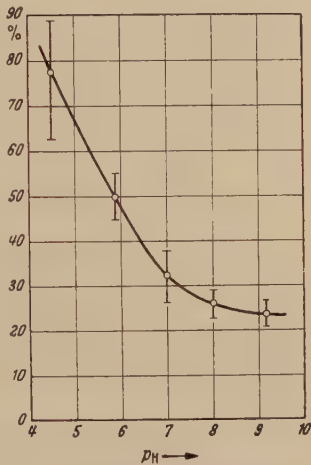


Abb. 1. *Saccharomyces cerevisiae*. Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf den Prozentsatz der beim Gefrieren absterbenden Zellen. (Meßpunkte: Mittelwerte aus 4 Versuchsreihen).

Tabelle VII. Abnahme der Keimzahl.

10³ Keime je 1 ccm Aufschwemmung A = vor B = nach dem Gefrieren und Auftauen in Pufferlösungen,

<i>Bacterium prodigiosum</i>							
p _H	A	B	% Abnahme	p _H	A	B	% Abnahme
4,5	4710	132	97,2	9,2	4130	1040	74,8
	2370	78	96,7		2840	622	78,1
	1170	119	89,8		984	370	62,4
	6830	485	93,3		7310	1960	73,2
Mittlere Abnahme:			94,7%	Mittlere Abnahme:			72,1%

Tabelle VII. (Fortsetzung.)

Pseudomonas fluorescens

pH	A	B	% Abnahme	pH	A	B	% Abnahme
4,5	2070	555	73,2	9,2	2180	1640	24,7
	822	188	77,1		775	556	28,2
	6190	1640	73,5		6310	4580	27,4
	4120	1410	65,8		3840	2960	22,9
Mittlere Abnahme:			72,4%	Mittlere Abnahme:			25,8%

Pseudomonas pyocyanea

pH	A	B	% Abnahme	pH	A	B	% Abnahme
4,5	3180	25	99,2	9,2	3370	553	83,6
	2030	57	97,2		1860	530	71,5
	10900	65	99,4		12300	3940	68,0
	4250	64	98,5		4100	914	77,7
Mittlere Abnahme:			98,6%	Mittlere Abnahme:			75,2%

Vergleicht man die Zahl der überlebenden Zellen, so tritt die unterschiedliche Schädigung, die die Organismen beim Gefrieren in saurer und alkalischer Aufschwemmung erlitten, besonders deutlich hervor. Es überlebten von:

Bacterium prodigiosum bei pH 4,5 nur 5,3%, bei pH 9,2 dagegen 27,9%, also das **5,3-fache**,

Pseudomonas pyocyanea bei pH 4,5 nur 27,2%, bei pH 9,2 dagegen 74,2%, also das **2,7-fache**,

Pseudomonas fluorescens bei pH 4,5 nur 1,4%, bei pH 9,3 dagegen 24,8%, also das **18-fache**.

Für *Saccharomyces cerevisiae* betragen die entsprechenden Werte bei pH 4,5 nur 22,4%, bei pH 9,2 dagegen 76,4%, also das **3,4-fache**.

Es läßt sich also feststellen, daß eine Erhöhung der Wasserstoffionenkonzentration des Milieus, in dem die Organismen eingefroren werden, vor allem bei den kälteempfindlichen Arten die Absterbequote auch relativ besonders vergrößert.

b) Elektrolyte (Anionen- und Kationenwirkung).

Die nächste Versuchsreihe mit *Saccharomyces cerevisiae* beschäftigt sich mit dem Einfluß, den die Anwesenheit verschiedener Salze in der Aufschwemmungsflüssigkeit auf den Absterbeverlauf der Mikroorganismen beim Gefrieren ausübt. Dabei fanden sowohl die Kationen als auch die Anionen der betreffenden Salze Beachtung.

Um störende Wirkungen auf die Zellen durch stärkere Hypertonie zu vermeiden, dienten als Aufschwemmungen durchweg nur $\frac{1}{5}$ molare Lösungen, und zwar folgender Salze: NaCl, NaNO₃, Na₂SO₄; KCl, KNO₃, K₂SO₄; LiCl, LiNO₃, Li₂SO₄; CaCl₂ und MgCl₂.

Ein Vorversuch gab zunächst Aufschluß darüber, daß die $\frac{1}{5}$ molaren Lösungen der erwähnten Salze — selbst bei längerer Einwirkungsdauer bei Zimmertemperaturen — keine Minderungen der Keimzahlen von *Saccharomyces cerevisiae* herbeiführen. Sie üben also unter normalen Verhältnissen keine schädigende Wirkung aus.

Vor dem Einfrieren wurde die Hefe zunächst wiederholt in sterilem destilliertem Wasser zentrifugiert, um sie von den letzten Resten ihrer ursprünglichen Nährlösung zu befreien. Darauf wurde sie homogenisiert und alsdann in die verschiedenen Salzlösungen übertragen. Einfrieren und Auftauen erfolgten in der eingangs beschriebenen Weise, bei —24 bzw. +25° C.

Die auf S. 570 folgende Tabelle VIII zeigt die Abnahme beim Einfrieren in den verschiedenen Salzlösungen.

Saccharomyces cerevisiae weist also beim Einfrieren in den verschiedenen $\frac{1}{5}$ molaren Salzlösungen deutliche Resistenzunterschiede gegenüber der Kälte auf: Bei den Kationen ergibt sich die geringste Abnahme der Keimzahl beim Kalium, nur ein Geringes stärker ist die Abnahme beim Natrium, wesentlich stärker beim Magnesium und beim Calcium, und am stärksten beim Lithium.

Auch die verschiedenen Anionen führen zu unterschiedlichen Keimzahlverminderungen, die stets gleichsinnig verlaufen und sich zur Wirkung des gleichzeitig vorhandenen Kations addieren. Die schwächste Wirkung zeigt stets das Nitrat, eine mittlere das Chlorid, die stärkste das Sulfat. So bewirken unter den obigen Kombinationen das Kaliumnitrat und das Natriumnitrat die geringsten Abnahmen, während das Lithiumsulfat die stärkste Schädigung herbeiführt.

c) Hypertonie und Hypotonie.

Bei den Versuchen über den Absterbeverlauf von Mikroorganismen während des Gefrierens in hypertonischer Lösung war es wesentlich, zunächst einmal festzustellen, in welcher Weise die verwendete Kochsalzlösung an und für sich schon die darin aufgeschwemmten Mikroorganismen beeinflußt.

Zu diesem Zweck wurde zunächst eine konzentrierte Aufschwemmung der zu untersuchenden Mikroorganismenarten in physiologischer Kochsalzlösung hergestellt und alsdann davon je 1 ccm in 200 ccm 2-normale Kochsalzlösung bzw. zur Kontrolle in 200 ccm physiologische Kochsalzlösung übertragen. Nach einer Einwirkungsdauer von 30 Minuten bzw. 2 Stunden erfolgten die Keimzahlbestimmungen in üb-

Tabelle VIII. *Saccharomyces cerevisiae*, Abnahme der Keimzahl.A = vor, B = nach dem Einfrieren und Auftauen. 10^3 Keime je 1 ccm.

<u>KCl</u>			<u>KNO₃</u>			<u>K₂SO₄</u>		
A	B	% Abnahme	A	B	% Abnahme	A	B	% Abnahme
1240	828	33,3	780	560	28,2	2200	1360	38,2
630	436	30,7	1240	994	19,8	1360	720	47,1
3200	2340	26,7	958	652	32,1	4640	3260	29,8
2600	1660	34,5	4280	3160	26,2	928	524	43,5
918	710	22,6	3620	2800	22,8	816	390	52,0
602	456	24,3	1780	1400	20,4	1880	990	47,1

Mittlere Abnahme: **28,7** Mittlere Abnahme: **25,3** Mittlere Abnahme: **43,3**

<u>NaCl</u>			<u>NaNO₃</u>			<u>Na₂SO₄</u>		
2360	1440	38,8	640	468	26,9	1760	660	62,0
1780	1300	26,8	2260	1810	19,8	1200	716	40,0
4300	2546	40,8	1680	1320	21,0	3680	2400	35,0
880	626	29,0	1360	960	29,3	968	506	47,1
1240	924	25,4	880	726	17,3	1360	650	52,0
3660	2660	27,2	3120	2326	25,5	1840	1080	41,0

Mittlere Abnahme: **31,3** Mittlere Abnahme: **24,6** Mittlere Abnahme: **46,0**

<u>LiCl</u>			<u>LiNO₃</u>			<u>Li₂SO₄</u>		
984	504	48,8	3200	1880	41,4	2840	1180	58,0
2340	1310	44,0	1840	1050	43,0	1520	458	69,0
1680	730	56,6	640	450	29,7	968	486	49,0
3200	1210	62,2	1200	758	36,9	1360	376	72,0
1970	1090	44,7	2480	1300	47,6	3660	1160	68,0
1240	590	52,4	1680	1040	38,0	2080	936	55,0

Mittlere Abnahme: **51,1** Mittlere Abnahme: **39,4** Mittlere Abnahme: **62,0**

<u>MgCl₂</u>			<u>CaCl₂</u>		
A	B	% Abnahme	A	B	% Abnahme
1620	994	38,6	2140	1150	46,2
384	219	43,0	2800	1330	52,6
860	396	54,0	1480	944	36,2
3240	1556	52,0	3680	1930	47,5
2800	2020	27,9	712	413	42,0
4320	2420	44,3	1260	517	59,0

Mittlere Abnahme: **44,9** Mittlere Abnahme: **47,2**

licher Weise in D-Agar. Es wurden folgende Unterschiede ermittelt (Tab. IX):

Tabelle IX. *Keimzahl je 1 ccm.**Saccharomyces cerevisiae*

30 Minuten in physiol. NaCl-Lösung	3060 · 10 ³
30 Minuten in 2-n NaCl-Lösung	2600 · 10 ³

Unterschied: 15,1%

30 Minuten in physiol. NaCl-Lösung	714 · 10 ³
30 Minuten in 2-n NaCl-Lösung	583 · 10 ³

Unterschied: 18,3%

120 Minuten in physiol. NaCl-Lösung	414 · 10 ³
120 Minuten in 2-n NaCl-Lösung	336 · 10 ³

Unterschied: 19,0%

Pseudomonas fluorescens

30 Minuten in physiol. NaCl-Lösung	1980 · 10 ³
30 Minuten in 2-n NaCl-Lösung	1630 · 10 ³

Unterschied: 17,7%

Pseudomonas pyocyanea

30 Minuten in physiol. NaCl-Lösung	9300 · 10 ³
30 Minuten in 2-n NaCl-Lösung	1210 · 10 ³

Unterschied: 87,0%

120 Minuten in physiol. NaCl-Lösung	1820 · 10 ³
120 Minuten in 2-n NaCl-Lösung	209 · 10 ³

Unterschied: 88,5%

Bacterium rubidaenum

30 Minuten in physiol. NaCl-Lösung	215 · 10 ³
30 Minuten in 2-n NaCl-Lösung	119 · 10 ³

Unterschied: 47,6%.

Die Einwirkung der hypertonen Lösung und die Rückkehr in die normalen Verhältnisse des Nährbodens bewirkt demnach bei allen untersuchten Mikroorganismenarten einen deutlichen Rückgang der Keimzahl. Dabei werden jene Arten am stärksten betroffen, die auch die größte Empfindlichkeit gegenüber dem Gefrieren aufweisen. Die Dauer des Verweilens in der hypertonen Lösung spielt dabei keine wesentliche Rolle, vielmehr scheint die Dynamik des Wasserentzuges bzw. der Wiederaufnahme des Wassers den Tod der Zellen herbeizuführen.

Im Anschluß an diese Vorversuche wurden die Mikroorganismen, nachdem sie zunächst 30 Minuten lang bei Zimmertemperatur in 2-n

NaCl-Lösung verweilt hatten, in Reagensgläsern (je 10 cem Aufschwemmung) bei -24°C eingefroren und anschließend bei Zimmertemperatur aufgetaut. Es ergaben sich folgende Unterschiede (Tab. X):

Tabelle X. *Abnahme der Keimzahl.*

A = 30 Minuten in 2-n NaCl-Lösung, nicht eingefroren, B = 30 Minuten in 2-n NaCl-Lösung, dann eingefroren bei -24°C und aufgetaut bei Zimmertemperatur. 10^3 Keime je 1 cem.

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>			<i>Pseudomonas fluorescens</i>		
A	B	% Abnahme	A	B	% Abnahme
2600	2130	18,1	1680	1340	20,2
714	608	14,7	728	594	18,4
960	778	19,0	3420	2760	21,1
562	456	18,8			
1820	1570	13,7			
Mittlere Abnahme: 16,9%			Mittlere Abnahme: 19,9%		

<i>Pseudomonas pyocyanea</i>			<i>Bacterium rubidaeum</i>		
A	B	% Abnahme	A	B	% Abnahme
1210	224	81,5	119	28	76,9
3180	390	87,7	2480	576	76,8
6420	1260	80,4	4320	1260	70,8
Mittlere Abnahme: 83,2%			Mittlere Abnahme: 74,7%		

Es läßt sich also feststellen, daß die Mikroorganismen durch die Einwirkung der hypertonischen NaCl-Lösung eine beachtliche Keimzahlverminderung erfahren, die bei den einzelnen Arten verschieden stark ist. Friert man sie jedoch in diesem Zustande, nach dem Wasserentzug durch die hypertonische Lösung, ein, so erfolgt indessen eine deutlich geringere Abnahme der lebensfähigen Zellen als beim Gefrieren in physiologischer NaCl-Lösung, in der die Zellkolloide einen wesentlich höheren Quellungsgrad aufweisen. Durch den in der hypertonischen Lösung eintretenden Wasserentzug aus den Zellen werden also bereits bei Zimmertemperatur ein Teil jener Arbeit geleistet und gleichzeitig damit allem Anscheine nach auch ähnliche Schäden bewirkt, wie sie in isotonischer Lösung bei Einwirkung tieferer Temperaturen durch das Ausfrieren des Wassers aus dem Protoplasten herbeigeführt werden.

In einem weiteren Versuch wurden schließlich Aufschwemmungen von *Sacch. cerevisiae* in destilliertem Wasser, also unter hypertonischen Verhältnissen eingefroren. Zunächst ergab sich, daß die Hefe beim Verweilen in destilliertem Wasser bei Zimmertemperatur keine zahlenmäßige Beeinträchtigung erfährt. Beim Einfrieren in dem destillierten Wasser konnten jedoch um ein Geringes, aber eindeutig erhöhte Absterbequoten — im Vergleich zu den Befunden, wie sie sich beim

Gefrieren in physiologischer NaCl-Lösung ergaben — ermittelt werden. So wurden bei der Hefe, aufgeschwemmt in destilliertem Wasser, nach kurzem Einfrieren (-24°C) und Auftauen ($+25^{\circ}\text{C}$), folgende Abnahmen festgestellt (Tab. XI):

Tabelle XI. *Abnahme der Keimzahl.*

10³ Keime je 1 ccm, A = vor, B = nach Gefrieren und Auftauen in destilliertem Wasser.

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>			
A	B	% Abnahme	
616	409	33,6	Mittlere Abnahme: 35,4%
749	485	35,3	
803	470	41,5	
449	284	36,8	
1686	1180	30,0	
885	571	35,5	

Im Vergleich hierzu betrug die durchschnittliche Abnahme von *Saccharomyces cerevisiae* beim Einfrieren in physiologischer NaCl-Lösung dagegen nur **29,2%** (s. S. 559).

Die Erhöhung der Absterbequote der Hefe beim Einfrieren in der hypotonischen Umgebung dürfte sich aus der Tatsache erklären lassen, daß die Zellen in diesem Zustande ihre maximale Wassersättigung aufweisen, so daß sie sowohl beim Gefrieren durch einen besonders starken Wasserentzug als auch beim Auftauen durch einen heftigeren Wassereinbruch stärker gefährdet sind.

d) Komplexe Umweltbedingungen.

Eine weitere Versuchsreihe sollte ermitteln, welchen Einfluß komplexe Milieuverhältnisse auf die Absterbequote von Mikroorganismen beim Gefrieren ausüben. Im Gegensatz zu den früheren Versuchen, in denen stets nur der Einfluß eines einzelnen Umweltfaktors auf den Absterbeverlauf untersucht wurde, befanden sich die Mikroorganismen nunmehr während des Einfrierens in einem zusammengesetzten Nährboden, in dem durch den Gehalt an organischen Stoffen, insbesondere Zucker, Kolloide (Pepton, Agar bzw. Gelatine) und verschiedene Salze weitgehend balancierte Verhältnisse geschaffen waren.

Zu diesem Zweck wurden zunächst gleiche Mengen einer verdünnten Aufschwemmung von *Sacch. cerevisiae* in Petrischalen hineinpipettiert und dann mit verflüssigtem, 40°C warmen D-Agar übergossen. Das Einfrieren erfolgte bei -24°C . Es stellte sich allerdings heraus, daß das Agar nach dem Auftauen das ausgefrorene Wasser nur unvollkommen wieder aufnimmt, so daß die Oberfläche des Nährbodens überschwemmt wird. Es entwickeln sich dann bei Bebrütung auf dem Substrat verwachsene, ineinanderfließende Kolonien, die sich nicht auszählen lassen. Außerdem erschwert auch das Agar wegen seiner hohen

Erstarrungstemperatur eine gleichmäßige Verteilung der Keime. Diese Nachteile zeigen sich jedoch nicht bei Verwendung von gelatinehaltigem Nährboden, so daß für die folgenden Versuche das Agar durch 15% Gelatine ersetzt wurde; die übrige Zusammensetzung des Nährbodens blieb die gleiche wie beim D-Agar (s. S. 557), lackmusneutral.

Dabei wurden die Keime zunächst in die Reagensröhrchen mit dem verflüssigten Gelatinenährboden hineinpipettiert und wegen des niedrigen Erstarrungspunktes der Gelatine ließ sich eine gute Verteilung der einzelnen Zellen bereits vor dem Ausgießen des Nährbodens in die Petrischalen herbeiführen. Es ergaben sich folgende Abnahmen (Tab. XII):

Tabelle XII. *Abnahme der Keimzahl.*

A = vor, B = nach dem Einfrieren und Auftauen in D-Gelatine.

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>					
A	B	% Abnahme			
433	389	10,2			
485	440	9,3			
726	631	13,0			
842	702	16,6	Mittlere Abnahme der Keimzahl:		
187	167	10,7			
			12,0%		
<i>Pseudomonas pyocyanea</i>			<i>Pseudomonas fluorescens</i>		
A	B	% Abnahme	A	B	% Abnahme
2419	1532	36,5	1152	988	12,4
987	644	32,7	184	165	10,3
1680	872	48,1	787	649	17,5
550	380	30,9	874	788	9,8
1270	970	23,6	3320	2890	12,9
Mittlere Abnahme: 34,4%			Mittlere Abnahme: 12,9%		

Die Hefe erfuhr demnach beim Einfrieren in dem kolloidreichen Nährboden mit einer Absterbequote von 12% eine merklich schwächere Verminderung der Keimzahl als beim Gefrieren in physiologischer Kochsalzlösung, dort starben beim Gefrieren in Reagensgläsern (s. S. 559) durchschnittlich 29,2% ab.

Noch auffälliger war der Unterschied bei der gegenüber dem Gefrieren besonders empfindlichen *Pseudomonas pyocyanea* (Tab. XII), deren Keimzahl beim Gefrieren in D-Gelatine um nur 34,4%, beim Gefrieren in physiologischer Kochsalzlösung aber um 93,6% vermindert wurde.

Für *Pseudomonas fluorescens* (Tab. XII) betrugen die entsprechenden Werte 12,9 bzw. 28,2%.

Der zusammengesetzte Nährboden übt also während des Einfrierens eine deutliche Schutzwirkung auf die Mikroorganismen aus. Dieser Schutz kann einerseits darauf zurückzuführen sein, daß beim Auftauen durch die Gegenwart der Kolloide in der Umgebung ein zu plötzlicher Wassereinbruch in die Zellen verhindert wird, so daß den Zellkolloiden Zeit zu einer gleichmäßigen und strukturschonenden Wiederaufnahme des Wassers gelassen wird. Andererseits ist aber auch damit zu rechnen, daß die Resistenz der Mikrobenzellen in einem gut balancierten System, das in einem komplexen Nährboden vorliegt, optimal beeinflusst wird.

3. Absterbeverlauf bei wiederholtem Gefrieren.

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, daß durch den Gefriervorgang und das anschließende Auftauen nur ein bestimmter Prozentsatz der ursprünglich vorhandenen Zellen abgetötet wird. Diese Absterbequote ist abhängig von der Organismenart und der Zusammensetzung des Milieus, in dem sich die Zellen während des Gefrierens befinden. Damit drängte sich nun die Frage auf, wie sich die Überlebenden gegenüber nochmaligem Gefrieren verhalten. Eine *verminderte* Absterbequote beim nochmaligen Gefrieren und Auftauen würde nämlich darauf schließen lassen, daß die einzelnen Zellen erhebliche Resistenzunterschiede gegenüber dem Kälteeinfluß aufweisen und die resistentesten Individuen einen weiteren Gefriervorgang mit erhöhter Wahrscheinlichkeit überstehen. Eine *größere* Absterbequote würde dagegen zu der Schlußfolgerung berechtigen, daß jene Zellen, die den ersten Gefrier- und Auftauprozeß überstanden haben, dennoch eine deutliche Schwächung ihrer Kälteresistenz erlitten und daher nochmaliges Gefrieren mit verminderter Wahrscheinlichkeit überleben. Und schließlich würde eine *gleichbleibende* Absterbequote bedeuten, daß sämtliche Zellen innerhalb einer Aufschwemmung die gleiche Kälteresistenz besitzen: Es würde also für das einzelne Individuum nur die Alternative bestehen, durch das Einfrieren entweder getötet oder aber überhaupt nicht geschädigt zu werden, so daß letzten Endes über das Schicksal jeder einzelnen Zelle der Zufall — jedoch mit bestimmter Wahrscheinlichkeit, wie die Absterbequote für die Gesamtzahl der Zellen angibt — entscheidet. Der Kältetod der Mikrobenzelle müßte demnach als Kettenreaktion im Anschluß an einen Primärakt erfolgen und im Sinne der JORDANSCHEN Treffertheorie gedeutet werden.

Über die Ergebnisse derartiger Untersuchungen wurde bereits an anderer Stelle berichtet (STILLE, 1944), so daß hier auf eine nochmalige Wiedergabe der Versuchsanordnung und einzelner Zahlenwerte verzichtet werden kann. Wesentlich ist die Tatsache, daß in Aufschwemmungen von Nichtsporenbildnern beim wiederholten Einfrieren und Auftauen jedesmal der gleiche Prozentsatz der Überlebenden abstarrt. So wurden z. B. von *Saccharomyces cerevisiae* beim ersten Gefrieren und Auftauen 28,7% der ursprünglich vorhandenen Zellen vernichtet,

beim zehnmaligen Einfrieren und Auftauen ergab sich stets annähernd die gleiche Abnahme, und zwar im Mittelwert 29,6%. Bei *Bacterium rabidaeum* betrug die Keimzahlverminderung beim ersten Gefrieren 82,2%; bei fünfmal wiederholtem Temperatursturz gingen durchschnittlich 82,7% zugrunde. Gleichsinnige Befunde ergaben sich für *Pseudomonas pyocyanea* und für *Bacterium tenellum*. Demnach ist der gesamte Absterbeverlauf dieser Mikroorganismen beim wiederholten Einfrieren und Auftauen exponentiell.

4. Verhalten der Mikroorganismen bei langfristiger Kälteeinwirkung: Einfluß verschiedener Temperaturen.

In den vorangehenden Abschnitten wurde über die Wirkung, die der Gefriervorgang und das anschließende Auftauen als *kurzfristige* Eingriffe auf die Mikroorganismen ausüben, berichtet. Besondere Beachtung fanden dabei verschiedene zusätzliche Faktoren, die den Einfluß der Kälte auf die Zellen unterstützen oder abschwächen. Die folgenden Ausführungen beschäftigen sich mit dem Verhalten der Mikroorganismen bei *langfristiger* Kälteeinwirkung.

Schon die einfache Beobachtung lehrt, das die allgemein verbreiteten Bodenorganismen, einschließlich der nichtsporenbildenden Arten, längere Frostperioden überdauern, um bei Eintritt zusagender Umweltbedingungen ihre Lebenstätigkeit wieder aufzunehmen. Auch der rasche Verderb, den die verschiedenartigsten Lebensmittel nach monatelanger Gefrierlagerung im aufgetauten Zustande erleiden, ist fast ausnahmslos auf überlebende Mikroorganismen und nicht auf Neuinfektionen zurückzuführen.

Während in der älteren Literatur nur vereinzelte Angaben über den langfristigen Kälteeinfluß auf Mikroorganismen zu finden sind, hat die rapide Entwicklung insbesondere der amerikanischen und englischen Gefrierindustrie in den letzten zwei Jahrzehnten zu einer fast unübersehbaren Fülle von Untersuchungen über diese Frage geführt. Die meisten dieser Arbeiten dienen rein praktischen Zielen und begnügen sich mit der Feststellung, daß bestimmte Organismenarten längere Gefrierzeiten überdauern, während verschiedentlich auch quantitative Angaben über die Verschiebung des zahlenmäßigen Verhältnisses der Mikroorganismen zueinander bei längerer Gefrierdauer gemacht werden. Im allgemeinen vermitteln diese Mitteilungen jedoch kein klares Bild von dem Absterbeverlauf bestimmter Bakterienarten, da meistens Mischinfektionen untersucht werden. Aufschlußreicher für eine statistische Auswertung sind indessen die Ergebnisse der Autoren, die mit Reinkulturen arbeiteten, insbesondere die Untersuchungen von WALLACE und PARK, HAINES und McFARLANE. Soweit geeignete Versuchsobjekte gewählt wurden (nichtsporenbildende Bakterien und Hefen in gleichmäßiger Aufschwemmung), lassen die mitgeteilten Werte unschwer auf einen exponentiellen Absterbeverlauf der Mikroorganismen während längerer Gefrierdauer schließen, da bei Umrechnung die Absterbequoten pro Zeiteinheit ziemlich konstante Werte aufweisen. Ein kleines Zahlenbeispiel soll diesen

Vorgang veranschaulichen: Haben in einer gleichmäßigen Aufschwemmung 4000 Zellen das Einfrieren überstanden, so sterben während der anschließenden Gefrierlagerung nach einer bestimmten Zeiteinheit schließlich 50% der anfangs vorhandenen Zellen ab, so daß sich ihre Zahl auf 2000 vermindert. Um eine weitere Abnahme auf 1000 Zellen herbeizuführen, ist dann wiederum die gleiche Zeiteinheit erforderlich. Nach gleichen Zeitabständen erfolgt dann ebenfalls die Verminderung der Überlebenden auf 500, 250, 125 usw.

Es ist einleuchtend, daß die Abnahme der Keimzahl während des stationären Gefrierzustandes wesentlich langsamer verläuft als bei dem raschen Vorgang des Einfrierens; anderenfalls ließe sich nämlich bereits durch eine kurzfristige Aufbewahrung der Aufschwemmungen bei Gefriertemperaturen völlige Sterilität herbeiführen.

Besondere Beachtung verdienen in diesem Zusammenhange die Befunde von HAINES, der feststellte, daß die Lagertemperatur von wesentlicher Bedeutung für den Absterbeverlauf der Mikroorganismen ist, und daß Bakterienaufschwemmungen bei einer Gefriertemperatur von -20°C in vielen Fällen wesentlich länger lebensfähig blieben als solche, die nur wenig unterhalb des Gefrierpunktes aufbewahrt wurden. In Übereinstimmung dazu konnte nachgewiesen werden, daß die natürlichen Zellproteine in schonend gewonnenen Extrakten von *Pseudomonas pyocyanea* bei -2°C wesentlich rascher koagulierten als bei -20°C .

Die folgenden Versuchsreihen zeigen das Verhalten von *Saccharomyces cerevisiae* während der Gefrierlagerung bei -4° , -15° und -24°C . Da es erforderlich erschien, Aufschwemmungen mit hoher Keimdichte zu verwenden, wurden die Zellen aus der ursprünglichen Nährlösung zunächst durch Zentrifugieren angereichert, um dann das Sediment in physiologischer Kochsalzlösung aufzunehmen und auf eine geeignete Konzentration zu verdünnen. Dann wurde diese Aufschwemmung auf eine größere Serie steriler Reagensgläser verteilt und nach der Bestimmung des Anfangskeimgehaltes zunächst bei -24°C eingefroren. Darauf wurden die Gläser zur Weiterlagerung teils in Gefrierräumen mit einer Temperatur von -4°C und -15°C übertragen, teils verblieben sie bei -24°C . Nach bestimmten Zeitabständen erfolgten dann Keimzahlbestimmungen; dabei wurde für jede einzelne Ermittlung stets ein besonderes Röhrchen entnommen (Tab. XIII u. Abb. 2).

Tabelle XIII. Absterbeverlauf.
Saccharomyces cerevisiae (Versuchsreihe 1)

Keimzahl je ccm vor dem Gefrieren: 220 · 10 ⁷	Logarithmus Keimzahl: 9,34
Nach Einfrieren bei -24°C und Auftauen: 159 · 10 ⁷	9,20

Abnahme beim Einfrieren: 27,7%

Tabelle XIII. (Fortsetzung.)

Lagerdauer in Tagen	— 4° C	Log	— 15° C	Log	— 24° C	Log
0	159 . 10 ⁷	9,20	159 . 10 ⁷	9,20	159 . 10 ⁷	9,20
3	603 . 10 ⁶	8,78	105 . 10 ⁷	9,02	135 . 10 ⁷	9,13
8	417 . 10 ⁶	8,62	528 . 10 ⁶	8,72	758 . 10 ⁶	8,88
15	745 . 10 ⁵	7,87	566 . 10 ⁶	8,75	502 . 10 ⁶	8,70
25	341 . 10 ⁵	7,53	241 . 10 ⁶	8,38	525 . 10 ⁶	8,72
58	209 . 10 ³	5,32	160 . 10 ⁵	7,20	513 . 10 ⁵	7,71
77	429 . 10	3,63	593 . 10 ⁴	6,77	269 . 10 ⁵	7,43

Die rasche Abnahme der Keimzahl bei — 4° C und die Richtung der Absterbekurve deuteten darauf hin, daß nach ausreichender Lagerdauer schließlich völlige Sterilität der Aufschwemmung herbeigeführt wird.

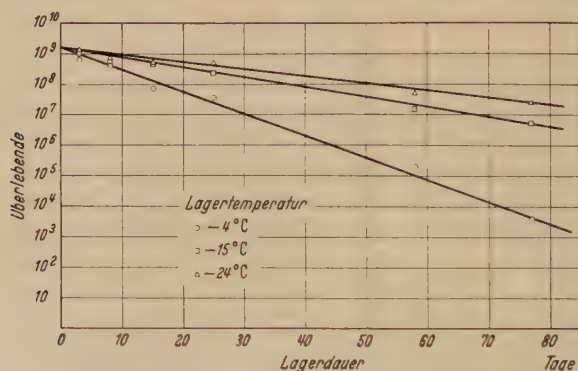


Abb. 2. Absterbeverlauf von *Saccharomyces cerevisiae* bei verschiedener Temperatur (— 4°, — 15 u. — 24° C).

Ein weiterer Versuch (Tab. XIV) bestätigte diese Vermutung. Die Lagertemperaturen waren — 4° und — 24° C.

Tabelle XIV. Absterbeverlauf.

<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Versuchsreihe 2)	
Keimzahl je cem vor dem Gefrieren:	Log Keimzahl:
157 . 10 ⁵	7,20
Nach dem Gefrieren bei — 24° C und Auftauen:	
106 . 10 ⁵	7,03

Abnahme beim Einfrieren: 32,5 %

Tabelle XIV. (Fortsetzung.)

Lagerdauer in Tagen	— 4° C	Log	— 24° C	Log
0	106 · 10 ⁵	7,03	106 · 10 ⁵	7,03
4	284 · 10 ⁴	6,45	798 · 10 ⁴	6,90
16	663 · 10 ³	5,82	304 · 10 ⁴	6,48
24	118 · 10 ³	5,07	191 · 10 ⁴	6,28
29	104 · 10 ³	5,02	114 · 10 ⁴	6,06
36	962 · 10	3,98	856 · 10 ³	5,93
50	333 · 10	3,52	747 · 10 ³	5,87
75	17	1,23	133 · 10 ³	5,12
97	—	—	665 · 10 ²	4,82

Die bei — 4° C aufbewahrte Hefeaufschwemmung erwies sich also bereits nach einer Lagerzeit von 97 Tagen als steril. Demgegenüber erfolgte nach gleicher Zeitdauer bei — 24° C eine zwar beachtliche Verminderung der Keimzahl — um mehr als zwei Zehnerpotenzen —, der noch verbliebene Keimgehalt entsprach indessen nur der Abnahme, die bei — 4° C bereits nach 30 Tagen eingetreten war.

Die Absterbegeschwindigkeit der Mikroorganismen im eingefrorenen Zustande wird wiederum entscheidend durch die Milieuverhältnisse der Aufschwemmungsflüssigkeit beeinflusst. So erfolgt die Abnahme bei saurer Reaktion der Umgebung wesentlich rascher als bei neutralen oder alkalischen Verhältnissen. In zuckerhaltigen Nährlösungen eingefrorene Bakterien- und Hefezellen bleiben erheblich länger lebensfähig als solche, die nur in physiologischer Kochsalzlösung eingefroren wurden. Das gleiche gilt auch für die Anwesenheit von Kolloiden, die den Absterbeverlauf deutlich verlangsamen. Es ist somit auch selbstverständlich, daß durch derartige besondere Verhältnisse auch jene Unterschiede, die sich hinsichtlich der Absterbegeschwindigkeit zwischen den bei verschiedenen Gefriertemperaturen aufbewahrten Aufschwemmungen ergeben, erheblich verstärkt oder abgeschwächt werden können.

Zur Beurteilung der Frage, wie weit unter natürlichen Bedingungen Mikroorganismen längere Frostperioden überstehen können, spielen derartige Faktoren ebenfalls eine beträchtliche Rolle. Die besondere Zusammensetzung gefrorener Lebensmittel wird gleichzeitig auch den Absterbeverlauf der anwesenden Mikroben entscheidend beeinflussen. In gleicher Weise ist auch die Beschaffenheit des Bodens für die darin eingefrorenen Mikroorganismen von Bedeutung, und je nach dem Kolloidgehalt, dem Salzgehalt, der Wasserführung, der H-Ionenkonzentration

und den allgemeinen Strukturverhältnissen werden entsprechende Unterschiede im Absterbeverlauf in Erscheinung treten.

Das rasche Absterben der Hefezellen bei den höheren Gefriertemperaturen könnte vermuten lassen, daß es sich dabei möglicherweise um ein schnelleres „Verhungern“ oder eine ähnliche Erschöpfung handeln könnte. Tatsächlich sind ja auch die Mikroorganismen und selbst ihre Dauerformen im latenten Zustand, wenn auch z.T. außerordentlich lange, doch nicht unbegrenzt lebensfähig. Im vorliegenden Falle wäre also zunächst die Annahme berechtigt, daß die Hefezellen bei Unterschreiten bestimmter Temperaturen zwar die Aufnahme von Nährstoffen aus ihrer Umgebung und alle meßbaren aktiven Lebensäußerungen vollkommen einstellen, daß aber dennoch ein gewisser innerer Stoffwechsel im Protoplasten weiterläuft, dessen Reaktionsgeschwindigkeit mit sinkender Temperatur verlangsamt wird.

Die Klärung dieser Frage brachte ein Kontrollversuch, in dem das Verhalten von Hefezellen ohne Nährstoffzugabe bei Temperaturen oberhalb des Gefrierpunktes verfolgt wurde. Die Hefe (Kultur 48 Stunden alt) wurde zunächst durch mehrfaches Zentrifugieren in physiologischer Kochsalzlösung vollständig von den letzten Spuren ihrer ursprünglichen Nährlösung befreit und dann in physiologischer NaCl-Aufschwemmung während eines längeren Zeitraumes bei $+30^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Bei zwei gleichsinnigen Versuchen ergaben laufende Keimzahlbestimmungen folgende Werte: (Tab. XV u. Abb. 3).

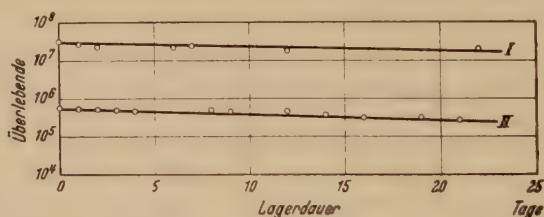


Abb. 3. *Saccharomyces cerevisiae* Abnahme der Keimzahl bei $+30^{\circ}\text{C}$ in physiologischer Kochsalzlösung.

Obgleich der Hefe während dieser Versuche nicht die geringsten Nährstoffe geboten wurden, nahm die Zahl der lebensfähigen Zellen im Verlaufe der Lagerzeit trotz der hohen Temperatur nur ganz unerheblich, und zwar wesentlich geringer als bei allen Gefriertemperaturen ab. Vergleicht man die Befunde, die sich bei den verschiedenen Temperaturen ($+30^{\circ}\text{C}$; -4°C ; -15°C ; -24°C) ergaben, so läßt sich feststellen, daß die beschleunigte Abnahme der lebensfähigen Zellen bei -4°C nicht auf eine Erschöpfung der Reservestoffe oder allgemein auf ein „Verhungern“ zurückzuführen ist; es muß vielmehr im kritischen Temperaturbereich um -4°C die Zelle besonders starke Schädigungen erfahren, die bei noch tieferen Gefriertemperaturen (-24°C und darunter) wesentlich geringer sind und die ihr bei Temperaturen oberhalb des Gefrierpunktes erspart bleiben.

Tabelle XV. *Absterbeverlauf.*

Saccharomyces cerevisiae, Verhalten in physiologischer Na-Cl-Lösung während der Aufbewahrung bei + 30° C.

Tage	Versuch I		Versuch II	
	Keimzahl je cem	Log Keimz.	Keimzahl je cem	Log. Keimz.
0	333 . 10 ⁵	7,52	563 . 10 ³	5,75
1	277 . 10 ⁵	7,44	544 . 10 ³	5,74
2	227 . 10 ⁵	7,36	531 . 10 ³	5,72
3	—	—	512 . 10 ³	5,71
4	—	—	480 . 10 ³	5,68
5	—	—	—	—
6	219 . 10 ⁵	7,34	—	—
7	243 . 10 ⁵	7,39	—	—
8	—	—	493 . 10 ³	5,69
9	—	—	440 . 10 ³	5,64
10	—	—	—	—
11	—	—	—	—
12	174 . 10 ⁵	7,24	491 . 10 ³	5,69
13	—	—	—	—
14	—	—	354 . 10 ³	5,55
15	—	—	—	—
16	—	—	315 . 10 ³	5,50
17	—	—	—	—
18	—	—	—	—
19	—	—	325 . 10 ³	5,51
20	—	—	—	—
21	—	—	261 . 10 ³	5,42
22	208 . 10 ⁵	7,30	—	—

Besprechung der Befunde.

Bei den untersuchten Mikroorganismenarten kann der Kältetod einzelner Individuen zu drei verschiedenen Zeitpunkten erfolgen: 1. beim Einfrieren, 2. während des Verweilens im eingefrorenen Zustande, 3. beim Auftauen. Die gesamte Absterbequote setzt sich aus diesen drei Komponenten zusammen. Würde nämlich der Auftauvorgang das einzig mögliche Gefahrenmoment darstellen, dann hätten weder die Gefrier- geschwindigkeit noch ein längerer Aufenthalt bei tiefen Temperaturen irgend einen Einfluß auf die Zahl der getöteten Zellen. Somit kann die Auffassung jener Autoren, die allein dem Auftauen die entscheidende Bedeutung beimessen — wenigstens soweit es die hier unter- suchten Objekte betrifft —, nicht bestätigt werden. Ebenso wenig stellt aber auch der Gefriervorgang, bzw. das Einfrieren die einzige Gefahren- quelle für die Mikroorganismen dar; denn dann würde es belanglos sein, ob das Auftauen rasch oder langsam erfolgt.

Die Tatsache, daß eine erhöhte Gefriereschwindigkeit den Mikroorganismen weniger schädlich ist als langsames Einfrieren, könnte zunächst den Schluß nahelegen, daß der Kältetod durch eine mechanische Schädigung der Zelle infolge der Kristallisation des Wassers herbeigeführt wird. Bei langsamer Abkühlung hat das Wasser Zeit, sich zu sammeln, grobkristallin auszugefrieren und so innerhalb der Zelle wesentlich stärkere Verletzungen herbeizuführen als beim raschen Gefrieren, bei dem sich zahlreiche feinere Kristalle ausbilden, falls nicht sogar ein glasartiger Zustand, wie A. und S. GOERTZ annehmen, eintritt. Die Feststellung, daß unterschiedliche Umweltbedingungen (Änderung des pH -Wertes, der Anionen und der Kationen, des osmotischen Wertes) die Kälteempfindlichkeit beeinflussen, braucht dem nicht zu widersprechen; sie ließe sich durchaus mit der Annahme eines mechanisch bedingten Kältetodes vereinbaren. Denn all diese Faktoren dürften nicht nur die Entquellung der Zellkolloide, sondern auch die Kristallisation wäßriger Lösungen unterschiedlich beeinflussen.

Das weitere Absterben einzelner Zellen während des Verweilens im eingefrorenen Zustande könnte ebenfalls auf mechanische Verletzungen zurückgeführt werden. Es wäre möglich, daß unter anhaltender Kälteinwirkung innerhalb der Zellen Umkristallisationen des ausgefrorenen Wassers erfolgen, die durch Zerstörung lebenswichtiger Strukturen den Tod herbeiführen. Verläuft nun ein solcher Vorgang langsamer bei tiefen als bei mäßigen Gefriertemperaturen, so wird damit die Tatsache verständlich, daß das Absterben einzelner Individuen umso langsamer erfolgt, je tiefer die Aufbewahrungstemperatur ist.

Gegen einen Kältetod durch Kristallbildung sprechen indessen verschiedene Gründe. Als die wichtigsten erscheinen folgende:

1. Beim Auftauen sterben weitere Zellen ab. Wenn bei diesem Vorgange auch noch Umkristallisationen des Eises eintreten sollten, so ist dennoch schwer einzusehen, warum diese beim langsamen Auftauen, das für die Organismen schonender ist, weniger heftig verlaufen sollen als beim raschen Auftauen.

2. Kälteempfindliche Arten (z. B. *Pseudomonas pyocyanea*) sind auch besonders empfindlich gegenüber hypertonen Lösungen. Sie beantworten also den Wasserentzug auch in diesem Falle, der nichts mit einer Kristallbildung zu tun hat, in ähnlicher Weise wie beim Gefrieren.

Die Vorstellung von MÜLLER-THURGAU über die Ursachen des Kältetodes, die in der Folgezeit insbesondere durch GORKE, FISCHER, HARVEY und KYLIN verfolgt wurde, läßt sich ebenfalls mit den vorliegenden Ergebnissen nicht vereinbaren. Nimmt man nämlich an, daß die mit dem Wasserentzug einhergehende Konzentrationserhöhung der im Protoplasma gelösten Substanzen schließlich eine Giftwirkung ausübt und das kolloidale Gleichgewicht innerhalb der Zelle stört, so wären die größten Schäden bei besonders tiefen Gefriertemperaturen zu erwarten. In Wirklichkeit führen jedoch die sehr tiefen Temperaturen — infolge erhöhter Gefriereschwindigkeit — geringere Schädigungen herbei als

mäßige Gefriertemperaturen. Auch die Tatsache, daß im eingefrorenen Zustande die Abnahme der Keimzahl umso langsamer erfolgt, je tiefer die Aufbewahrungstemperatur ist, widerspricht dieser Auffassung. Und schließlich würde es für die Zahl der Überlebenden dann auch völlig belanglos sein, ob das Auftauen rasch oder langsam erfolgt.

Auch die Theorie von SACHS und HOPPE-SEYLER, die später vor allem durch ILJIN weiterentwickelt wurde, läßt sich aus den gleichen Gründen mit den vorliegenden Befunden nicht restlos in Einklang bringen. Sie gibt zwar eine sehr einleuchtende Erklärung für die schonende Wirkung des langsamen Auftauens und für resistenzerhöhende Bedingungen, doch kann sie die schonende Wirkung raschen Gefrierens und tiefer Lagertemperaturen nicht erklären.

Die Ansicht von MEZ, nach der das Unterschreiten bestimmter spezifischer Temperaturminima den Kältetod bewirkt, kann für die hier untersuchten Objekte keine Gültigkeit haben. Sie wird durch die Feststellung widerlegt, daß sehr tiefe Temperaturen keine besonderen Schäden verursachen. Auch der Einfluß, den die unterschiedliche Auftaugeschwindigkeit auf die Zahl der Überlebenden ausübt, spricht gegen diese Auffassung.

Von den bisherigen Vorstellungen über die Ursachen des Kältetodes scheint demnach keine Theorie geeignet zu sein, alle die oben mitgeteilten, an Mikroorganismen gewonnenen Ergebnisse völlig aufzuklären. Dadurch soll indessen ihr Wert, den sie z. T. für die Deutung von Einzelercheinungen haben, die während der Kälteeinwirkung eintreten, keineswegs eingeschränkt werden. Aber insgesamt dürften die Vorgänge, die bei Eintritt des Todes innerhalb der Zelle ablaufen, ebenso schwer zu überblicken und in ihrer tatsächlichen Bedeutung zu erfassen sein wie jene Erscheinungen von kompliziertester Feinheit, die das Leben bedingen. So kann auch die vorliegende Arbeit die Frage nach einem „Mechanismus“ des Kältetodes nicht beantworten, sondern lediglich einige Einzelbeobachtungen zu diesem Problem beitragen.

Folgender Punkt scheint mir besondere Beachtung zu verdienen: Alle Forscher, die sich bisher mit dem Kältetode beschäftigten, betrachteten das gesamte Protoplasma in all seinen Bestandteilen entweder als gleichmäßig empfindlich gegenüber der Kälteeinwirkung, oder aber, falls sie hinsichtlich der Kälteempfindlichkeit einzelner Zellelemente unterscheiden, dann suchen sie besondere Schädigungen der Plasmamembranen. Die eigenen Ergebnisse deuten jedoch nicht in diese Richtung. Wenn nämlich die Summierung zahlreicher Schäden an vielen, im gesamten Protoplasma oder an dessen Oberfläche verteilten Kolloiden den Tod der Zelle herbeiführen würde, dann wäre ein exponentieller Absterbeverlauf, der sich beim wiederholten Einfrieren und Auftauen homogener Aufschwemmungen von Mikroorganismen ergibt, kaum möglich. Es müßten dann, falls alle Individuen unter sich gleich sind, bei der Kälteeinwirkung entweder alle Zellen gleichzeitig zugrunde gehen oder alle gleichzeitig überleben. Und auch dann, wenn die Zellen unter-

einander gewisse Resistenzunterschiede aufweisen würden und die schwächsten zuerst absterben, könnte im Endergebnis nicht immer wieder ein exponentielles Absterben erfolgen: denn in diesem Falle würde ein derartiger Absterbeverlauf voraussetzen, daß beim ersten Gefrieren und Auftauen zunächst die empfindlichsten Zellen absterben und daß dann bei den wiederholten Gefrier- und Auftauvorgängen immer wieder genau der gleiche Prozentsatz der Überlebenden eben so weit geschwächt wird, daß er dem nächsten Temperatursturz erliegen muß.

Wie bereits in einer früheren Mitteilung (STILLE, 1944) ausgeführt, deutet der immer wieder beobachtete exponentielle Absterbeverlauf vielmehr darauf hin, daß der Kältetod primär durch die Zerstörung eines lebenswichtigen engbegrenzten Teiles der Zelle herbeigeführt wird, bei dem es sich möglicherweise nur um eine besonders empfindliche Molekülgruppe handelt. Die übrigen Veränderungen, die sich im Anschluß daran an dem Organismus vollziehen, sind dann nur noch von sekundärer Bedeutung. Die Resistenz der gesamten Zelle kann daher nur so groß sein wie die Resistenz des empfindlichsten ihrer lebenswichtigen Anteile. Auch für den Kältetod von Mikroorganismen scheint daher die von P. JORDAN entwickelte „Treffertheorie“ Gültigkeit zu haben: die Analyse des Trefferereignisses bietet in diesem Falle jedoch erhebliche Schwierigkeiten und es läßt sich bisher nicht entscheiden, ob dieser Vorgang mehr mechanischer oder mehr biochemischer Art ist. Es spricht vieles für die Annahme, daß ein derartiges „Steuerungszentrum“ im Zellkern lokalisiert ist, dessen Vorhandensein auch für die Bakterien durch eine Reihe von Untersuchungen in neuerer Zeit mit großer Wahrscheinlichkeit erwiesen werden konnte (STILLE, PIEKARSKI, STAPP, KNAYSL, ROBINOW, VAN ITERSON u. a.).

Die Tatsache, daß abgeänderte Umweltbedingungen die Absterbequote der Mikroorganismen beim Einfrieren, bzw. den Absterbeverlauf im eingefrorenen Zustande beeinträchtigten, spricht nicht gegen eine primäre entscheidende Schädigung innerhalb des Zellkernes. Der Kern wird von dem übrigen Protoplasten schützend umgeben; daher können Änderungen der Schutzwirkung des Protoplasten, die durch Elektrolyte, Wasserstoffionen und ähnliche Einwirkungen herbeigeführt werden, sich auch auf die Resistenz des Zellkernes und seiner Teile übertragen.

Zusammenfassung.

Untersuchungen über die Wirkung des Einfrierens und Auftauens auf Mikroorganismen (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Ps. pyocyanea*, *Bacterium rubidaeum*, *Bact. prodigiosum*, *Bact. tenellum*, *Bact. odiosum*) führten zu folgenden Ergebnissen:

1. Die Zahl der Überlebenden wird entscheidend durch die Geschwindigkeit des Einfrierens und des Auftauens bestimmt. Langsames Einfrieren und rasches Auftauen bewirken die stärksten, rasches Einfrieren und langsames Auftauen die geringsten Abnahmen.

2. Beim Einfrieren ist der für die Mikroorganismen schädliche Temperaturbereich bei -24°C bereits durchlaufen, so daß eine weitere Temperatursenkung auf -193°C keine weiteren Abnahmen herbeiführt.

3. Die Absterbequote wird wesentlich durch zusätzliche Faktoren beeinflusst. Hohe Wasserstoffionenkonzentration vermindert die Kälteresistenz der Mikroorganismen, die Kationen und Anionen verschiedener Neutralsalze haben bereits in geringer Konzentration eine spezifische Wirkung, die Anwesenheit von Kolloiden in der Aufschwemmungslüssigkeit übt eine Schutzwirkung auf die Mikroorganismen aus.

4. Die kälteempfindliche *Pseudomonas pyocyanea* wird durch hypertotonische Lösungen ebenfalls besonders stark geschädigt.

5. Beim mehrfachen Gefrieren und Auftauen homogener Aufschwemmungen bleibt die Absterbequote konstant. Infolgedessen ergibt sich insgesamt ein exponentieller Absterbeverlauf.

6. Bei langfristiger Kälteeinwirkung auf homogene Aufschwemmungen erfolgt ebenfalls ein exponentielles Absterben. Die Geschwindigkeit, mit der die Keimzahl abnimmt, richtet sich nach der Zusammensetzung des Milieus, in dem sich die Mikroorganismen befinden, und nach der Temperatur, bei der sie aufbewahrt werden. Das Absterben erfolgt bei -4°C wesentlich rascher als bei -15 und -24°C ; je tiefer die Temperatur, desto langsamer ist der Absterbeverlauf.

7. Der Kältetod kann bei allen untersuchten Arten demnach zu drei verschiedenen Zeitpunkten eintreten: während des Gefrierens, während des Verweilens im eingefrorenen Zustande und während des Auftauens.

8. Die bisherigen Theorien über die Ursachen des Kältetodes gestatten keine restlose Erklärung der vorliegenden Ergebnisse. Der exponentielle Absterbeverlauf spricht für die Annahme, daß der Kältetod bei den hier untersuchten Objekten primär durch ein einzelnes Trefferereignis im Zellkern ausgelöst wird.

Nachtrag:

Nach Abschluß vorliegender Untersuchungen erschien eine Mitteilung von G. BREDEMANN, K. GARBER, P. HARTECK und KL. SUHR: Die Temperaturabhängigkeit der Lebensdauer von Blütenpollen, Naturwissenschaften, **34**, 279—280 (1947). Die Verfasser konnten feststellen, daß die Pollen von *Lupinus polyphyllus* Lindl. das Einfrieren nicht nur überstehen, sondern daß ihre Lebensdauer durch Aufbewahrung bei tiefen Gefriertemperaturen ebenfalls erheblich verlängert wird. Auf Grund einer Berechnung glauben die genannten Autoren zu der Schlußfolgerung berechtigt zu sein, daß die Keimfähigkeit der Pollen bei -80°C etwa ein Jahrzehnt und bei -190°C infolge äußerster Reaktionsverminderung sogar innerhalb Jahrmillionen erhalten bleiben dürfte.

Literatur.

- ÅKERMAN, A.: Bot. Not. 49—64 und 105—126 (1919). — ÅKERMAN, A.: Studien über den Kältetod und die Kälteresistenz der Pflanzen, Lund, 1927.
- BARTEZKO, H.: Jahrb. wiss. Bot. 47, 57—98, (1910). — BĚLEHRÁDEK, J.: Temperature and living matter. Protoplasmamonographien, Bd. 8, Borntraeger, Berlin, 1935. — BIGELOW, W. D. and ESTY, J. R.: Journ. Infect. Diseases, 27, 602, (1920). — BROADHURST, J. and GILPIN, L.: Journ. of Bact. 11, 95 (1926).
- CHODAT, R.: Bull. de l'Herbier Boissier. 4, 89 (1896). — COHEN, B.: Journ. of Bact. 7, 183 (1922).
- FISCHER, H. W.: Beitr. z. Biologie der Pflanzen 10, 133—234 (1911).
- GOETZ, A. und GOETZ, S. S.: Naturwissenschaften. 26, 427 (1938). — GÖPPERT, H. R.: Über die Wärmeentwicklung in den Pflanzen, deren Gefrieren und Schutzmittel gegen dasselbe. Breslau, 1830. — GORKE, H.: Landwirt. Versuchsstation, 65, 149 (1906).
- HAINES, R. B.: Proc. Roy. Soc. London (B), 124, 451 (1938). — HARVEY, R. B.: Journ. Agr. Res. 15, 83 (1918). — HOPPE-SEYLER: Physiologische Chemie. I. Allgemeine Biologie. Berlin, 1877.
- ILJIN, W. S.: Protoplasma, 29, 105 (1935). — ILJIN, W. S.: Jahrb. wiss. Bot. 66, 947 (1927). — VAN ITERSON, W.: Biochimica et Biophysica Acta, 1, 527 (1947). — JORDAN, P.: Naturwissenschaften, 26, 537 (1938). — JORDAN, P.: Protoplasma, 32, 464 (1939). — JORDAN, P.: Biol. Zentralbl. 59, 1 (1939).
- KESSLER, W.: Planta, 24, 312 (1935). — KESSLER, W. und RUHLAND, W.: Planta, 28, 205 (1938). — KNAYSI, G.: Journ. of Bact. 43, 365 (1942). — KNAYSI, G., Journ. of Bact. 53, 539 (1947). — KYLIN, H.: Ber. d. D. Bot. Ges. 35, 370 (1917).
- LEPESCHKIN, W. W.: Kolloidchemie des Protoplasmas, Borntraeger, Berlin, 1924. — LEPESCHKIN, W. W.: Protoplasma, 37, 404 (1943). — LOTTERMOSER, A.: Ber. d. D. Chem. Ges. 41, 3976 (1908).
- McFARLANE, V. H.: Food Research, 5, 43 (1940). — McFARLANE, V. H.: Food Research, 5, 59 (1940). — MACFAYDEN, A.: Proc. Roy. Soc. London, 66, 180 (1900). — MACFAYDEN, A.: Proc. Roy. Soc. London, 71, 76 (1902). — MAXIMOV, N. A.: Ber. d. D. Bot. Ges. 30, 52, 293, 504 (1912). — MAXIMOV, N. A.: Jahrb. wiss. Bot. 53, 237 (1914). — MEZ, C.: Flora 94, 89 (1905). — MOLISCH, H.: Untersuchungen über das Erfrieren der Pflanzen. Jena, 1897. — MÜLLER-THURGAU, H.: Landw. Jahrb. 9, 133 (1880). — MÜLLER-THURGAU, H.: Landw. Jahrb. 15, 453 (1886). —
- PICTET, R.: Arch. Sci. Phys. et Nat. T. 21 (1884). — PIEKARSKI, G.: Arch. f. Mikrob. 8, 428 (1937). — PIEKARSKI, G.: Arch. f. Mikrob. 11, 406 (1940).
- RAHM, P. G.: Verh. D. Zool. Ges. 106 (1924). — ROBINOW, C. F.: Proc. Roy. Soc. London, B. 130, 299 (1942). — ROBINOW, C. F.: Journ. Hyg. 43, 413 (1944).
- SACHS, J.: Landw. Versuchsstation, 2, 167 (1860). — SCHAFFNIT, E.: Mitt. Kaiser-Wilh. Institut, Landw. Bromberg, 3, 93 (1910). — SCHANDER, R. und SCHAFFNIT, E.: Landw. Jahrb. 52, 1 (1919). — STAPP, C.: Zentralbl.

Bakt. II, **102**, 251 (1940). — STAPP, C.: Zentralbl. Bakt. II, **105**, 1 (1942). — STILES, W.: Protoplasma, **9**, 459 (1930). — STILLE, B.: Arch. f. Mikrobiol. **8**, 125 (1937). — STILLE, B.: Arch. f. Mikrobiol. **13**, 293 (1944). — STRUGGER, S. und HILBRICH, P.: Deutsche Tierärztl. Wochenschr. **50**, 121 (1942). — STRUGGER, S.: Flora, N. F. **37**, 73 (1943).

TSCHISTJAKOW, F. M. und BOTSCHAROWA, S. S.: Mikrobiologia, **7**, 498 (1938) (Russ.), Ref. Zentralbl. Bakt. II, **100**, 164 (1939). — TSCHISTJAKOW, F. M. und NOSKOWA, G. L.: Mikrobiologia, **7**, 565 (1938) (Russ.), Ref. Zentralbl. Bakt. II, **101**, 471 (1939).

WALLACE, G. J. and TANNER, F. W.: The Fruit Products Journ. **14**, 235 (1935). — WALLACE, G. J. and PARK, S. E.: Journ. Infect. Diseases, **52**, 156 (1933). — WIEGAND, K. M.: Plant World, **9**, 107 (1906).

ZACHAROWA, T. M.: Jahrb. wiss. Bot. **65**, 61 (1926).

(Aus dem Institut für Pflanzenkrankheiten der Universität Bonn.)

Weitere Beobachtungen über das Zusammenleben von *Ophiobolus graminis* und anderen Bodenmikroben mit Hilfe der Aufwuchsplatten.

Von

A. GERHARD WINTER.

Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 23. Dezember 1948.)

In einer vorangegangenen Arbeit (WINTER 1949) konnte gezeigt werden, daß *Ophiobolus graminis* mit anderen Bodenmikroben, insbesondere Pilzen, alle möglichen Arten des Zusammenlebens [Parabiose, Eusymbiose, Dyssymbiose (SCHAEDE) in Form eines Parasitismus von Seiten des *Ophiobolus* oder des anderen Partners] eingeht. Stets kam es dabei allerdings nur zu einem parallelen Hyphenverlauf der beiden Pilze; niemals gingen von dem Leithyphe, dem sich der Begleithyphe in seiner Wuchsform ja anpaßt, Reize aus, die bei der Aus-



Abb. 1. *Ophiobolus graminis* und Begleithyphe. Cholodny-Präparat. Vergr. 60 mal.

bildung einer Seitenhyphe den Begleithyphe veranlassen, gleichenorts mit der Bildung einer dieser Seitenhyphe begleitenden Abzweigung zu reagieren. Die Abb. 1 zeigt nun eine solche Art der Beeinflussung auf einem Cholodny-Objektträger, der mit *Ophiobolus graminis* beimpft war und 14 Tage in Gartenerde verblieb.

Die dunkle, breite *Ophiobolus*-Leithyphe wird auf der rechten Seite von einem Pilz mit helleren, schmalere Hyphen begleitet, der an den Punkten 1, 2 und 3 gleichzeitig mit *Ophiobolus graminis* nach rechts Seitenhyphen abzweigt und diese *Ophiobolus*-Seitenäste auch weiterhin begleitet, wie man besonders gut an den Punkten 4 und 5 erkennt, wo er sich mit einer Seitenhyphe nunmehr vom *Ophiobolus*-Myzel trennt. In der Photographie ist dieses Zusammenleben beider Pilze nur streckenweise deutlich zu erkennen, da sie zu dicht nebeneinander oder gar untereinander liegen und der

im Präparat infolge der Doppelfärbung mit Methylenblau und Phenylerythrosin vorhandene Farbkontrast (*Ophiobolus* blau, Begleithyphe rot) nur schwach hervortritt. Im oberen Teil des Präparates zwischen

der Abzweigung der zweiten und dritten Hyphe fruktifiziert der Begleitpilz (6), ohne daß es allerdings möglich war, die Artzugehörigkeit zu bestimmen. Diese synchrone Verzweigung beider Pilze ist nun kein Zufall. Sie wiederholt sich in allen Teilen des Präparates, wo die beiden Pilze sich überwachsen, regelmäßig. Insbesondere findet sich in dem an den unteren Teil des Bildes angrenzenden Gesichtsfeld diese gleichzeitige

Seitenhyphenbildung schon vom Beginn des Zusammenwachsens beider Pilze an drei, d. h. an allen Verzweigungsstellen auf der rechten Seite des *Ophiobolus*-Myzels. Es erfolgt also hier stets nur eine gleichzeitige Ausbildung von Seitenhyphen und zwar an insgesamt 6 unmittelbar aufeinander folgenden Stellen. Dabei ist diese Symbiose nicht so eng, daß sich der Begleitpilz nicht doch wieder aus dem Bereich der *Ophiobolus*-

Hyphen heraus begeben könnte, wie man in der Abbildung an den Punkten 4 und 5 erkennen kann.

Analoge Bilder ergeben sich, wenn *Ophiobolus graminis* bei der Ausbildung plektenchymatischer Hyphenknäuel, die häufig die Bildung von Perithezien einleiten, auf diesen Pilz trifft (Abb. 2 und 3). Sie bilden dann in diesem Be-

reich der Aufwuchsplatte zusammen ein Gewebe, an dem beide Pilze — allerdings *Ophiobolus graminis* zum überwiegenden Teil und, weil er der Leitpilz ist, formgebend — beteiligt sind. In dem Präparat selbst läßt sich der Anteil beider Pilze an diesem Gewebe infolge ihrer verschiedenen Anfärbung weitgehend verfolgen und beobachten, wie unentwirrbar sie miteinander verflochten sind. Es entsteht also ein gemischtes Plektenchym, das vielleicht als eine Analogie zu dem Zusammenleben von Algen und Pilzen in den Halbflechten aufgefaßt

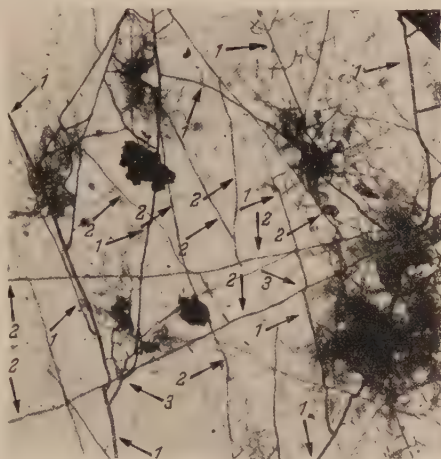


Abb. 2.

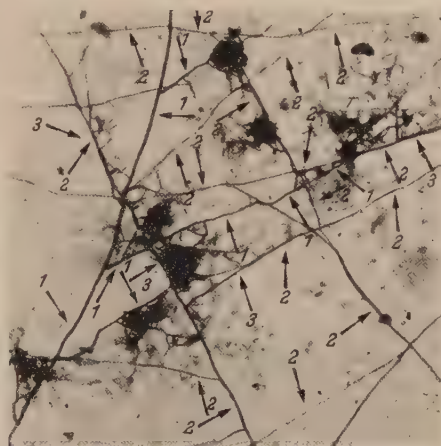


Abb. 2 u. 3. *Ophiobolus graminis* und Begleitpilz mit plektenchymatischen Hyphenknäueln. Cholodny-Präparat. Vergr. 60 mal.

werden kann, wie sie SCHMID (1933) und THOMAS (1939) in den grünen Algenüberzügen auf Baumrinden beobachtet haben. In den Bildern sind nur die Haupthyphen der beiden Pilze gekennzeichnet, und zwar *Ophiobolus* durch Pfeile mit der Nr. 1, der Partner durch Pfeile mit der Bezeichnung 2. Wie man an dem leichten Knick der *Ophiobolus*-Hyphen beim Überwachsen der Hyphen des Begleitpilzes in Abb. 2 (Pfeile 3) und ebenso in der Abb. 3 daran erkennt (Pfeil 3), daß das *Ophiobolus*-Plektenchym sich weitgehend in den von dem Begleitpilz vorgeschriebenen Rahmen einpaßt, ist der Bodenpilz hier als erster zur Stelle gewesen. Bei gleichzeitigem Eintreffen beider wachsender Myzelien oder etwas späterer Entwicklung des Begleitpilzes am Ort der Plektenchymbildung darf man erwarten, daß infolge der starken Anpassung des Begleitpilzes an *Ophiobolus graminis* die Verwachsung bei der Plektenchymbildung noch enger sein würde. Wie die schon erwähnten leichten Richtungsänderungen der *Ophiobolus*-Hyphen beim Kreuzen des Begleitpilzes (Abb. 2, Pfeile 3) zeigen, wird auch *Ophiobolus graminis* durch den Begleitpilz in seinem Habitus, wenn auch nur sehr schwach, beeinflußt.

Gleichzeitige Verzweigung des Leit- und Begleitpilzes werden auch sehr häufig angetroffen, wenn Actinomyceeten sich auf *Ophiobolus*-Hyphen angesiedelt haben. Sie sitzen nämlich in der Regel nicht neben, sondern auf der *Ophiobolus*-Hyphe, wo sie nun bei Verzweigung des *Ophiobolus*-Myzels nach rechts oder links in gleicher Weise von Reizen getroffen werden, die sie regel- ja gesetzmäßig zur Verzweigung nach der Seite veranlassen, auf der die Seiten-

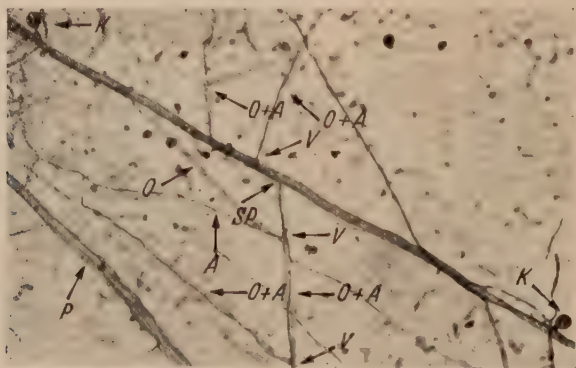


Abb. 4. *Ophiobolus graminis*, von Actinomyceeten begleitet und einen Bodenpilz begleitend. Cholodny-Präparat. Vergr. 160 mal.

hyphenbildung erfolgt. So entsteht das Bild eines Actinomyceeten-Myzels, das den *Ophiobolus*-Hyphen aufliegt und ihnen in alle und zwar auch die feinsten Verästelungen hinein folgt, also gleichsam einen Abdruck des *Ophiobolus*-Myzels darstellt.

Die Abb. 4 zeigt einen Ausschnitt von einem Cholodny-Objektträger, der mit *Ophiobolus graminis* beimpft und für 14 Tage in

eine Gartenerde eingebracht wurde, die mit 5% Biomalzzusatz — auf das Bodenwasser berechnet — versetzt war. Obwohl auf ihr solche gleichzeitigen Verzweigungen von *Ophiobolus*-Hyphen (O) und eines auf ihr angesiedelten Actinomyceten (A) nur an drei Stellen (V) zu erkennen sind, und es in angrenzenden Gesichtsfeldern bedeutend eindrucksvollere Bilder über weite Strecken hin erkennbarer, gleichzeitiger Verzweigungen gibt, sei diese Abbildung hier doch wegen der sonstigen auf ihr vereinigten Eigenarten wiedergegeben. Bei der diagonal durch das Bild laufenden dunklen Hyphe mit den konidienartigen Gebilden an den äußersten Enden (K) handelt es sich um den gleichen Pilz, der, wie früher gezeigt wurde (WINTER 1949, Abb. 22 bis 23), von *Ophiobolus graminis* begleitet und parasitiert wird, ihm eine enorme Überentwicklung ermöglicht, bisher aber niemals fruktifizierend vorgefunden wurde. Auch hier erkennt man, wie das Myzel von *Ophiobolus graminis* (Sp) beim Berühren der diagonal laufenden Hyphe nach links umbiegt und der dunklen Hyphe eine Strecke weit folgt, und wie (bei P) eine *Ophiobolus*-Hyphe in dem Zellinneren des von ihm begleiteten oder parasitierten Bodenpilzes wächst, während *Ophiobolus* selbst (O) wieder von Actinomyceten (A) unter weitgehender Formanpassung und synchroner Verzweigung (V) begleitet wird.

Besonders eindrucksvoll zeigt sich das enge Zusammenleben und die Beeinflussung der Wuchsform bei Pilzen und Actinomyceten in den Abbildungen 5 und 6. „Rittlings“ auf dem *Ophiobolus*-Myzel (Abb. 5), das hier sehr blaß gefärbt ist, sitzt ein Strahlenpilz, der sich an keiner Stelle vom *Ophiobolus*-Myzel lösen konnte und stets eine mit seinem „Wirt“ synchrone Verzweigung erkennen läßt. Die Abbildung 6 dagegen zeigt das Zusammenleben dreier Hyphen von *Fusarium* sp. mit Actinomyceten. Deutlich ist zu erkennen, wie die *Fusarium*-Hyphen von unten her dichter zusammenwachsen, um dann wieder auseinanderzubiegen. Nur in dieser Zone größter gegenseitiger Annäherung, die auf dem Bilde festgehalten wurde, sind Querverbindungen zwischen den auf den drei Hyphen angesiedelten Actinomyceten-Fäden feststellbar. Die seitlichen Verzweigungen werden schon im unteren und oberen Teil der Abbildung seltener, um bei weiterer Entfernung

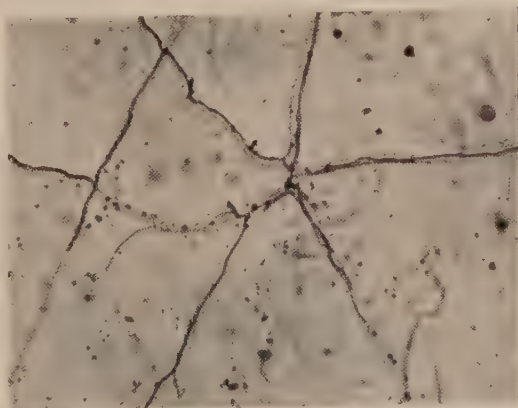


Abb. 5. *Ophiobolus graminis* von einem Actinomyceten besiedelt. Vergr. 252 mal.

der *Fusarium*-Hyphen voneinander ganz zu unterbleiben. Erst bei Annäherung der *Fusarium*-Hyphen bis unterhalb einer kritischen Grenze kann sich also eine Ablösung der Actinomycceten von den *Fusarium*-



Abb. 6. *Fusarium* sp. von einem Actinomycceten besiedelt. Vergr. 225 mal.

Hyphen häufiger vollziehen. Es liegen hier analoge Verhältnisse vor wie in der Rhizosphäre des Weizens. *Ophiobolus graminis* ist im natürlichen Boden durch ein Reizgefälle an die Wurzeloberfläche oder doch die unmittelbare Wurzelumgebung des Weizens gebunden. Seitenhyphen mit einer aus der Rhizosphäre herausführenden Wachstumsrichtung werden daher stets gezwungen, in bogenförmigem Wuchs in die unmittelbare Umgebung der Wurzel zurückzukehren. Nur wenn sich eine zweite Wurzel in großer Nähe befindet, geht diese Bindung verloren, und es beginnt infolge Nivellierung des Reizgefälles ein lebhaftes Hin und Her von Hyphen zwischen den beiden benachbarten Wurzeln.

Das Fehlen völlig reproduzierbarer Verhältnisse bei diesen Beobachtungen muß als ein Mangel empfunden werden, insbesondere dann, wenn es sich nicht

um die reine Feststellung der gegenseitigen Beeinflussung, sondern auch um ihre Kausalanalyse handelt. Es darf aber hervorgehoben werden, daß bei dem Zusammentreffen zweier verschiedener Pilze stets ein ganz charakteristisches Verhalten beobachtet wurde. Mit anderen Worten: es wird nicht eine zufällige, sondern eine gesetzmäßige Reaktion der beiden Partner festgestellt. Erst diese Tatsache gibt den Beobachtungen eine wissenschaftliche Basis. Das zeigt sich insbesondere, wenn man die Platten in einigem Abstand mit zwei verschiedenen Pilzen beimpft, die sich schließlich mit ihren Rändern überwachsen. Je nach der Art der Pilze zeigen die sich berührenden Hyphen ein ganz bestimmtes Verhalten, eine gegen- oder einseitige oder auch fehlende Beeinflussung der Wuchsform, die im ganzen Bereich der sich überwachsenden Myzelien einheitlich ist. Hierbei lassen sich starke Beeinflussungen der Wuchsformen durch den Partner feststellen, wie wir sie hier zwischen *Ophiobolus graminis* und einem der Artzugehörigkeit nach unbekannten Pilz (Abb. 1—3) beobachteten. Doch wird über diesen Fragenkomplex in Kürze gesondert berichtet.

Literatur.

SCHMID, G.: Zur Ökologie der Luftalgen. — Ber. d. Dtsch. Bot. Ges. **45** (1927).

THOMAS, E. A.: Über die Biologie der Flechtenbildner. — Beitr. z. Kryptogamenflora d. Schweiz. **9** (1939).

WINTER, A. G.: Untersuchungen über die Beziehungen zwischen *Ophiobolus graminis* und anderen Organismen mit Hilfe der Aufwuchsplattenmethode. — Archiv f. Mikrobiologie **14**, 240 (1949).

(Aus dem Laboratorium für botanische Mittelprüfung der Biologischen
Zentralanstalt Braunschweig.)

Zwei neue Arten der *Saprolegniaceen*.

Von

HEINRICH JOHANNES.

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 17. Januar 1949).

Bei hydrobiologischen Untersuchungen im Altwarmbüchener Moor bei Hannover und vergleichenden Untersuchungen an einem Hochmoor des Roten Bruches bei Braunlage im Harz fand ich zwei neue Vertreter der Familie der *Saprolegniaceae*, die im folgenden beschrieben werden sollen. Sie wurden über ein Jahr in Kultur gehalten und veränderten in keiner Weise ihre Charakteristika.

1. *Saprolegnia uliginosa* sp. n.

(Vergleiche hierzu Abbildung 1 a—e.)

Die Hyphen erreichen auf Hanfsamen eine Länge bis zu 3 cm, sie sind dünn und schlaff und haben im Durchschnitt $12\text{--}17\ \mu$ Breite. Die primären Zoosporangien stehen endständig, sind zylindrisch bis keulenförmig, an der Basis $20\text{--}22\ \mu$ und an der dicksten Stelle bis $35\ \mu$ breit; ihre Länge schwankt nur wenig von $190\text{--}240\ \mu$. Vereinzelt treten kleine Sporangien auf ($12.8\text{--}16 < 130\ \mu$). Die Zoosporen liegen zu mehreren nebeneinander, in den kleinen Sporangien in einer oder zwei Reihen, sie schlüpfen normal aus, einzystieren sich dann und durchlaufen ein zweites Schwimmstadium: $9.5\text{--}10\ \mu$ im Durchmesser. Sekundäre Sporangien entstehen immer als Durchwachsungen der primären und sind dann an den Austrittspapillen der älteren Sporangien eingeschnürt. Oogonien entstehen nicht allzu reichlich an den Haupthyphen an kurzen seitlichen Stielen, sehr selten terminal, nie interkalar. Die Stiele der Oogonien sind immer gerade und werden nicht länger als $\frac{1}{2}$ -Oogondurchmesser, meistens nur $\frac{1}{4}$ so lang. Gelegentlich wurde ein kleiner Einwuchs vom Stiel in das Oogonium beobachtet. Die Oogonien sind immer kugelig mit ($3\ \mu$) dicker Membran, die keine Tüpfel trägt, außer denen unter der Ansatzstelle der Antheridien (Durchmesser 5.5 bis $6.5\ \mu$). Häufige Oogondurchmesser sind: $40\text{--}70\ \mu$ ($60\text{--}65\ \mu$). Die Oosporen sind rund, zentrisch und liegen zu 3—8, meistens zu 5, in einem Oogon, sie messen $27\text{--}34\ \mu$ ($30\text{--}33\ \mu$) im Durchmesser. Antheridientragende Nebenäste entspringen androgyn an der Haupthyphenahe am Oogonstiel, aber nicht an ihm selbst; sie sind stark verzweigt und liegen zu mehreren dem Oogon an. Das abgeschnürte Antheridium

berührt das Oogon in seiner ganzen Breite und treibt durch Tüpfel einen bis mehrere Befruchtungsschläuche in das Innere. Sehr selten wurde bei Häufung von Oogonien ein diklines Antheridium beobachtet. Gemmen nicht häufig und recht vielgestaltig.

Gefunden im Altwarmbüchener Moor bei Hannover in einem Bomben-trichter, $pH = 6.3$. Kultiviert auf Hanfsamen und Ameisenpuppen, Einspor-kulturen über festen Nährboden nach RAPER (1936).

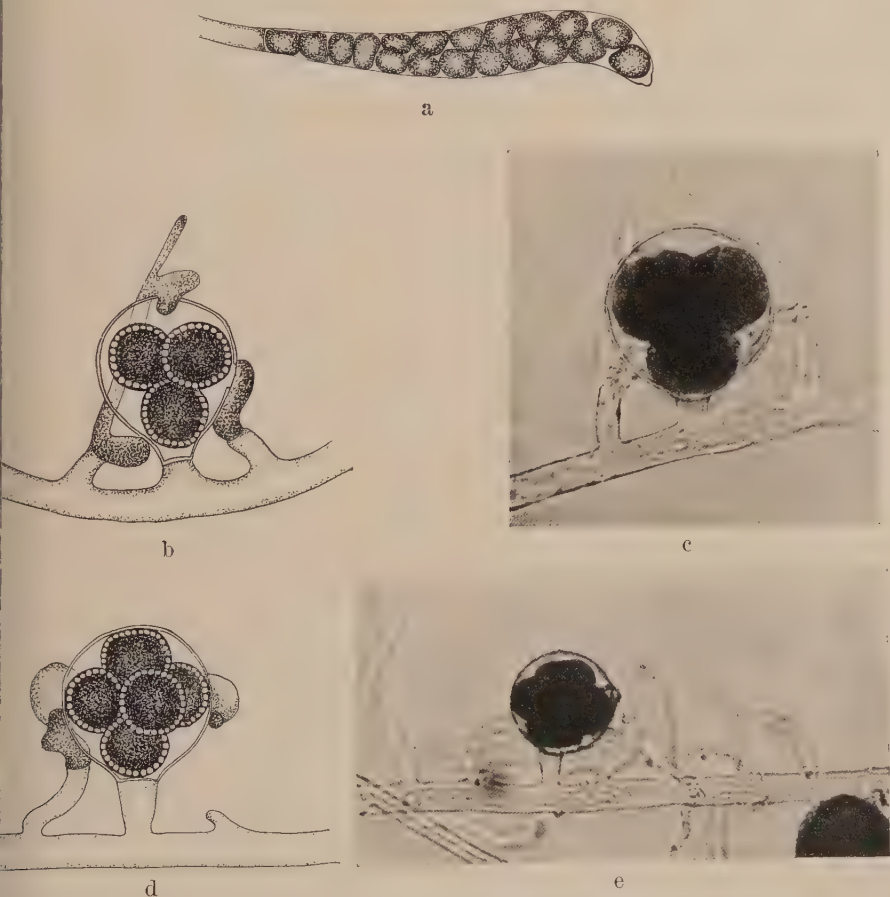


Abb. 1. *Saprolegnia uliginosa* sp. n. a) Kleines Sporangium mit nur einer Reihe von Sporen an der Basis (Orig.) (Vergr. $500\times$). b) Oogonium mit typischem Oogonstiel (Orig.). (Vergr. $300\times$). c) Typisches Oogonium (Orig.). (Vergr. $360\times$). d) u. e) Oogonen mit längstem Oogonstiel = $\frac{1}{2}$ Oogondurchmesser (Orig.). (Vergr. $300\times$ u. $230\times$).

Nachfolgende Art diagnose sei aufgestellt:

Saprolegnia uliginosa sp. n.

Hyphen dünn und schlank, bis zu 3 cm lang. Zoosporangien zylindrisch bis keulenförmig, $20-22 \times 190-240 \mu$, selten kleiner, typisch durchwach-

send. Zoosporen in mehreren Reihen, selten in einer Reihe, 9,5–10 μ . Oogonien auf sehr kurzen, seitlichen Stielen der Haupthyphen ($1/4$ – $1/2$ Oogondurchmesser), kugelig, 40–70 μ , meist 60–65 μ im Durchmesser, mit dicker (3 μ) Membran, ohne Tüpfel. Oosporen zu 3–8, meist 5, in einem Oogon, 27–34 μ , meist 30–33 μ , zentrisch. Antheridien androgyn an der Haupthyphye entspringend und zu mehreren am Oogon, keulenförmig. Gemmen selten und dann vielgestaltig.

Saprolegnia uliginosa sp. n.

Hyphae tenues et laxae, longitudo 3 cm. Prima sporangia cylindrica vel clavata, 20–22 \times 190–240 μ , raro minor, secunda sporangia recta pro genere. Zoosporae in ordinibus pluribus, raro in ordine una, 9,5–10 μ diam. Oogonia globosa, 40–70 μ (60–65 μ) diam., lateral, raro terminalia, non intercalaria; membrana hyalina, crassa (3 μ), sine poris. Oosporae centricae, 27–34 μ (30–33 μ) diam., 3–8, plerumque 5 in quoque oogonio. Rami antheridiales androgyni, initium ducent ex hypha principia.

Diese *Saprolegnia uliginosa* gehört damit unzweifelhaft zur *ferax*-Gruppe COKER's (1923) und steht der *Saprolegnia glomerata* (Tiesenh.) Lund (1934) sehr nahe. Gemeinsam ist beiden das Auftreten von einreihigen Zoosporangien und die Anordnung der Oogonien an den Haupthyphen an kurzen seitlichen Stielen, die allerdings entgegen der *S. uliginosa* bei *S. glomerata* die Länge des Oogondurchmessers erreichen können (bei *S. uliginosa* nur $1/2$) und nicht immer gerade sind und knotige Ausstülpungen aufweisen. Die Antheridien zeigen zwischen beiden Arten keine Unterschiede, weder in ihrem Entstehungsort noch in ihrer Ausbildung oder Anordnung. *S. uliginosa* unterscheidet sich aber deutlich von *S. glomerata* durch die größeren Oosporen, durch die tüpfelfreie und dicke Oogonmembran und die immer kürzeren und geraden gleichmäßigen Oogonstiele. Die einzystierten Zoosporen sind nie größer als 10 μ (*S. glomerata* 10–11 μ).

Zum selben engsten Verwandtschaftskreis gehört auch *S. monoica* var. *montana* de Bary. Von ihr unterscheidet sich *S. uliginosa* durch die einreihigen Sporangien, die wesentlich kleineren Oogonien ([40] 60–65 [70] μ gegen 70–90 μ bei *S. monoica* var. *montana*) und die wenig größeren Oosporen (30–33 μ gegen 25–31 μ bei *S. monoica* var. *montana*). Das gesamte Erscheinungsbild der *S. uliginosa* ist durch die bis 3 cm langen, gestreckten Hyphen lockerer, flutender als bei *S. monoica* var. *montana*, deren stets wellige Hyphen selten die Länge von 1 cm übersteigen. Auch ist die Bildung von Oogonien bei *S. uliginosa* oft so spärlich, daß diese makroskopisch kaum in Erscheinung treten.

Nahe verwandt ist *uliginosa* der *S. litoralis* Coker. Wenn mit *S. litoralis* auch Größe und Zahl der Oosporen weitgehend übereinstimmen, so fehlen der *S. uliginosa* die für *S. litoralis* charakteristischen Oogonien, ebenso fehlen die von COKER (1923, S. 55) genannten apikalen Fortsätze, besonders der terminalen Oogonien und die (bis 11 μ) großen Tüpfel in der Membran. Das Vorhandensein eines Einwuchses in das Oogon vom Oogonstiel her bei *S. uliginosa* unterscheidet sie ebenfalls von *S. litoralis*. Die verschieden große Ausdehnung des Rasens und die

länge der Hyphen (1—1.5 cm bei *S. litoralis* und 3 cm bei *S. uliginosa*) lassen eine Trennung von *S. litoralis* gerechtfertigt erscheinen.

Alle vier erwähnten Arten stehen somit der *S. monoica* Pringsh. recht nahe und gehören zum engeren *monoica*-Formenkreis in der *ferax*-Gruppe. Alle dazu gehörigen Arten [*S. monoica* Pringsh., *S. monoica* var. *montana* de Bary, *S. glomerata* (Tiesenh.) Lund, *S. litoralis* Coker] zeigen recht gleitende Übergänge in ihren Merkmalen, so daß sich heute die Arten oft nur im Vergleich mit den nächst verwandten Arten in der Kultur bestimmen lassen und es schon reicher Erfahrung bedarf, die einzelnen Arten nur auf Grund von kurzen Artdiagnosen zu charakterisieren. Inwieweit überhaupt der „Art“-Begriff im ursprünglichen Sinne noch bei den *Saprolegniaceen* gerechtfertigt ist, soll hier nicht näher untersucht werden. Sehr große und umfangreiche Arbeit wäre noch zu leisten, um unter den wechselvollsten Bedingungen die „Art-Konstanz“ bei den *Saprolegniaceen* zu überprüfen. Ich halte es deshalb auch nicht für richtig, diesen „Arten“ noch Varietäten unterzuordnen. Dabei schließe ich mich der Ansicht von LUND (1934, S. 15) an und bezeichnete die *S. monoica* var. *glomerata* Tiesenh. als besondere Art: *S. glomerata* (Tiesenh.) Lund. Aus demselben Grunde halte ich es für richtig, die andere Varietät der *S. monoica*, die var. *montana* de Bary, künftig als eigene Art: *S. montana* (de Bary) Minden zu führen, wie es schon MINDEN (1912, S. 516) und LUND (1934, S. 13) vorgeschlugen.

2. *Achlya turfosa* sp. n.

(Vergleiche hierzu Abbildung 2 a—e.)

Die Hyphen erreichen auf Hanfsamen eine Länge bis zu 1,3 cm, sie sind zwar kräftig, aber für die Gattung *Achlya* recht dünn und haben im Durchschnitt 25—35 μ Breite an der Basis und 20—27 μ in Höhe der Oogonien; ihre Enden sind wenig zugespitzt. Die primären Zoosporangien stehen stets terminal am Ende der Haupthyphen und sind keulenförmig und wenig dicker als die Hyphen. Ihre Länge schwankt beträchtlich (60—320 μ). Sie öffnen sich mit einer apikalen Papille und entlassen die Zoosporen in der für die Gattung charakteristischen Weise. Die enzystierten Zoosporen sind recht groß und haben einen Durchmesser von durchschnittlich 12,8 μ . Sekundäre Sporangien entstehen typisch durch seitliche Sprossung, dabei kommt es häufig vor, daß ein Hyphenstück unterhalb des primären Sporangiums zum sekundären Sporangium wird, unter dem sich dann wieder ein Hyphenstück zum tertiären Sporangium differenziert. Es entstehen dadurch Sporangienstände, wie ich sie oft bei *Achlya Klebsiana* Pieters vorfand. Die Oogonien bilden sich sehr zahlreich an seitlichen Stielen, die senkrecht von den Haupthyphen abstehen. Die Oogonstiele haben eine Länge vom 2—3fachen Oogondurchmesser und eine Breite von 10—12 μ . Interkalare Oogonien habe ich nie beobachtet. Die Oogonien sind immer kugelig mit durchsichtiger ungefärbter Membran, die morgensternartig

dicht mit kegelförmigen Papillen besetzt ist. Tüpfel wurden nicht beobachtet. Häufige Oogondurchmesser sind: $44\text{--}54\ \mu$ ohne Papillen; die Papillen selbst erreichen eine Höhe von $8\text{--}12.6\ \mu$. Die Oosporen sind kugelig, selten etwas durch Druck abgeplattet und messen in der Regel $28\text{--}32\ \mu$, doch kommen extreme Werte nach unten vor: $26.5\ \mu$, $19.6\ \mu$. Sie füllen das Oogon nie aus. Ihre Wand ist dünn und farblos und ihr



Abb. 2. *Achlya turfosa* sp. n. a) Habitusbild (Orig.). (Vergr. $60\times$). b) Sporangienstand (Orig.). c) Oogonienstand (Orig.). (Vergr. $100\times$). d) u. e) Typische Oogonien (Orig.). (Vergr. $350\times$ u. $200\times$).

Inhalt reift sehr spät und nicht sehr häufig; er zeigt zur Reife subzentrische Struktur, d. h. ein Kreis von Öltröpfchen umgibt geschlossen das Protoplasma, während der andere Kreis nur auf einer Seite kappenförmig das Plasma bedeckt. Die Zahl der Oosporen beträgt meistens

zwei oder drei, selten eins, sehr selten vier. Ihre Keimung konnte ich noch nicht beobachten. Die antheridientragenden Nebenäste sind unverzweigt und entspringen androgyn am Oogonstiel in seinem oberen Drittel dicht am Oogon und sehen oft den henkelartigen Antheridien der *Achlya racemosa* Hildebrand ähnlich. Es treten ein bis zwei Nebenäste in etwa gleichem Verhältnis an jedes Oogon heran, schnüren ein keuliges Antheridium ab, das sich mit seiner Spitze zwischen die Papillen schiebt und die Membran erreicht. Gemmen wurden nicht beobachtet.

Gefunden in der Bode an den kleinen Bodefällen nördlich Braunlage (Harz) als Abfluß aus den Mooren des Roten Bruches, $pH = 6,3-6,8$. Kultiviert auf Hanfsamen und Ameisenpuppen, Einsporkulturen über festen Nährboden nach RAPER (1936).

Es wird nachfolgende Artdiagnose aufgestellt:

Achlya turfosa sp. n.

Hyphen bis 1,3 cm lang, kräftig, doch dünner als gewöhnlich bei *Achlya*, an der Basis $25-35 \mu$ breit. Zoosporangien zylindrisch, selten dicker als die Haupthyphae, endständig, Erneuerung durch seitliche Sprossung, wobei sich oft ein Teil des Traghyphenplasmas mit zu Zoosporen differenziert. Ausschlüpfen und Schwärmen der Zoosporen wie beim Typus. Zoosporen enzystiert $12,8 \mu$ dick. Oogonien kugelig ($44-54 \mu$) mit farbloser Membran, die dicht mit kegelförmigen Papillen ($8-12,6 \mu$) besetzt ist, an senkrecht abstehenden Seitenästen von der Länge des 2-3fachen Oogondurchmessers. Zoosporen zu zwei oder drei in einem Oogon, selten eins oder vier, das Oogon nicht füllend, $28-32 \mu$ Durchmesser, oft eine kleine ($26,5 \mu$ oder $19,6 \mu$) Oospore neben einer normaler Größe, schwer reifend, subzentrisch. Antheridien 1-2 an jedem Oogon, androgyn am Oogonstiel unterhalb des Oogons entstehend, schwach keulig. Gemmen nicht beobachtet.

Achlya turfosa sp. n.

Hyphae validae, sed magis tenues quam recta in genere. Prima sporangia clavata, secunda sporangia recta pro genere saepe cum cella subsporangiale. Oogonia globosa, $44-54 \mu$ diam., terminalia in ramis transversis. Membrana sine colore, tecta conis papillis, longitudo $8-12,6 \mu$. Oosporae subcentricae, membrana hyalina, $28-32 \mu$ diam. vel minor, plerumque 2 vel 3, raro 1 vel 4, in quoque oogonio, non complent oogonium. Rami antheridiales androgyni initium ducent ex ramis ferentibus oogoniorum, recte unus ad quoque oogonium.

Die vorstehende Art steht unzweifelhaft der *Achlya radiosa* Maurizio sehr nahe und wurde nach dem Erscheinungsbild anfangs auch dafür gehalten. Nach sehr langer Kultur auf den verschiedensten Nährböden und unter den verschiedensten Bedingungen behielt sie aber ihre abweichenden Merkmale bei. Nachdem eine typische *Achlya radiosa* gefunden wurde, konnten beide Arten nebeneinander kultiviert werden, und nun traten die Unterschiede besonders hervor. Von der Originalbeschreibung von MAURIZIO (1899) weicht *Achlya turfosa* in wesent-

lichen Punkten ab. Zur Veranschaulichung der Unterschiede seien im folgenden die bekanntgewordenen Maße einander gegenübergestellt:

Art	Oogonien		Oosporen		
	Durchmesser ohne Warzen	Warzen	Zahl	Durchmesser	Struktur
<i>A. turfosa</i> (nach JOHANNES)	44—54	8—12,6	(1) 2—3	(26,6) 28—32	subzentrisch
<i>A. radiosa</i> (nach JOHANNES)	34—40	7—11	1 ((2))	33—37	?
<i>A. radiosa</i> (nach MAURIZIO)	31,5—46	7—12	1 (2)	29 (34—36,5) 39	?
<i>A. radiosa (asterophora)</i> (nach v. MINDEN)	45—50	11—15	1 ((2))	30—35	exzentrisch
<i>A. radiosa (decorata)</i> (nach PETERSEN)	30—45	(15)			?
<i>A. radiosa</i> (nach RICHTER)	37—46	10—12	1	37—40	?

Die wesentlichsten Unterschiede der *Achlya turfosa* gegen *Achlya radiosa* bestehen in den größeren Oogonien und den kleineren Oosporen, die nie das Oogon voll anfüllen und selten in der Einzahl vorhanden sind, sondern fast immer liegen zwei oder drei in einem Oogon. Außerdem sind weder die Membranen der Oogonien noch die der Oosporen besonders dick oder gefärbt. Von den anderen Arten der Gattung *Achlya*, die ebenfalls keine glatten Oogonien besitzen, unterscheidet sich *A. turfosa* ganz eindeutig:

Achlya colorata Pringsh. hat größere (30—37 μ) und zentrische Oosporen, die Warzen sind in der Regel wesentlich kleiner und stehen viel vereinzelter.

Achlya papillosa Humphrey hat kleinere (bis 25 μ) und zentrische Oosporen, keine Antheridien.

Achlya spinosa de Bary hat nur an 50 % der Oogonien Antheridien, die Oosporen sind von wechselnder Größe.

Achlya cornuta Archer hat kleinere Oogonien (25—30 μ) und keine Antheridien.

Achlya recurva Cornu hat mehr (bis 10) und kleinere (22—27 μ) Oosporen, die Antheridien sind androgyn und diklin.

Achlya crenulata Ziegler hat kleinere (22,2—39,7 μ) und exzentrische Oosporen, Antheridien sind diklin.

Trotz der unzweifelhaft großen Ähnlichkeit mit *Achlya radiosa* stelle ich *Achlya turfosa* in die *apiculata*-Gruppe des Subgenus *Euachlya* (COKER, 1923, S. 100), und zwar in deren ersten Teil zum Typus *Achlya*

apiculata de Bary. Es sprechen dafür: wenige Oosporen, subzentrische Struktur der Oosporen, Oosporen füllen nicht das Oogon ganz an, Wand ungetüpfelt, Antheridien androgyn.

Literatur.

ARCHER, W., 1867: On two species in Saprolegnieae. (Quart. Jour. Mic. Sci. **7**, S. 126).

DE BARY, A., 1888: Spezies der Saprolegnieen. (Bot. Ztg., **46**, S. 597 ff.).

COKER, W. C., 1923: The Saprolegniaceae with notes on other water molds. (The Univ. of North Carolina Press, Chapel Hill, N. C.). — CORNU, M., 1872: Monographia des Saprolegniées. (Ann. Sci. Nat. Bot. Ser. **5**, **15**).

HUMPHREY, J. E., 1893: The Saprolegniaceae of the United States with notes on other species. (Trans. Am. Phil. Soc. **17**, S. 63).

LUND, A., 1934: Studies on Danish Freshwater Phycomycetes and notes on their occurrence particularly relative to the hydrogen-ion-concentration of the water. (Mem. d. l'Acad. R. Sc. et des Lett. d. Denmark, Kopenhagen, **6**, S. 3).

MAURIZIO, A., 1899: Beiträge zur Biologie der Saprolegnieen. (Zeitschr. f. Fischerei und deren Hilfswissenschaften, **7**, S. 1). — v. MINDEN, M., 1912—1915. Saprolegniineae. (Kryptogamenflora der Mark Brandenburg, **5**, S. 479 ff.).

PETERSEN, H. E., 1909: Studier over Ferskvands-Phycomyceter (Botaniske Tidsskrift, **29**, S. 345).

RAPER, J. R., 1936: Heterothallism and sterility in *Achlya* and observations on the cytology of *Achlya bisexualis*. (Jour. Elish. Mitch. Sci. Soc. **52**, S. 274). — RICHTER, W., 1937: Vorarbeiten zu einer Saprolegniaceen-Flora von Marburg (Flora **31**, S. 227).

ZIEGLER, A. W., 1948: A new species of *Achlya* (Mycologia **40**, S. 336).

(Aus dem Physiologisch-chemischen Institut und den Botanischen Anstalten
der Universität Göttingen.)

Über die Ermittlung der chemischen Konstitution von Algenlipoiden mit Hilfe der Adsorptionsmethode.

(Versuche an *Chlorella*, *Scenedesmus* und *Nitzschia*).

Von

HANS KATHEN.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 5. Februar 1949).

Die bisher bekannt gewordenen Tatsachen über das Vorkommen und die chemische Struktur pflanzlicher Fette und Lipoiden stammen zum allergrößten Teil aus Untersuchungen an höheren Pflanzen, von denen im allgemeinen unschwer genügend Untersuchungsmaterial beschafft werden kann. Bei Mikroorganismen hat man dagegen oft nur sehr geringe Mengen von Material zur Verfügung, so daß die Ausarbeitung einer Mikromethode für die Fettbestimmung wünschenswert erschien.

Eine Reihe von Untersuchungen liegt bereits vor, die die Fettbildung bei Mikroorganismen unter den verschiedensten Kulturmethoden behandeln (BOKORNY, LINDNER, FINK u. JUST, DIRR u. v. SODEN, SCHWARZ, HARDER u. v. WITSCH, NILSSON, DAMM, BERNHAUER, RIFFEL-BALDES). Ziel dieser Untersuchungen war einmal, Einblick in den chemischen Aufbau und die stoffwechselchemische Leistungsfähigkeit der Einzeller zu bekommen, zum andern die Absicht, eine Lücke in unserem Bedarf an natürlichen Fetten zu schließen. Man beabsichtigte, auf mikrobiologischem Wege Fett für die menschliche Ernährung zu gewinnen. Von vielen heterotrophen Mikroorganismen, wie z. B. Hefe und anderen Pilzen, ist lange bekannt, daß sie unter besonderen Kulturbedingungen viel Fett in ihren Zellen bilden und speichern können. Aber auch autotrophe Mikroorganismen sind hierzu in der Lage (z. B. BARG), und HARDER und v. WITSCH gelang es, verschiedene Algen unter Bedingungen zu züchten, unter denen sie sich sehr intensiv vermehrten und auch viel lipoidlösliche Substanzen bildeten: zwei Grünalgen (eine *Chlorella*- und eine *Scenedesmus*-Art) und die Diatomee *Nitzschia palea* erwiesen sich dabei als besonders geeignet.

Über die chemische Natur der von diesen drei autotrophen Mikroorganismen gebildeten lipoidlöslichen Substanzen ist bisher nichts bekannt; sie aufzuklären war das Ziel der nachstehenden Untersuchungen. Diese Aufgabe wurde weniger im Hinblick auf ihre etwaige spätere praktische Bedeutung für die menschliche Ernährung durchgeführt als

in der Hoffnung, hier vielleicht Einblick zu gewinnen in die Frage, ob in autotrophen Mikroorganismen die gleichen Fette und Lipoiden vorkommen wie in den höheren Pflanzen (siehe hierüber auch RIPPEN-BALDES [1947]), ob diese autotrophen Einzeller also den gleichen Fermentapparat zur Fett- und Lipidsynthese besitzen wie höhere Pflanzen, und ob bei Anreicherung von Fetten und Lipoiden als Reserve- und Speichersubstanzen diese in ihrer Zusammensetzung den Fetten in Samen und Speicherorganen höherer Pflanzen gleichen.

Teil I: Ausarbeitung der Methodik.

In Anbetracht der geringen, aus den Algenkulturen zur Verfügung stehenden Fettmengen mußte zunächst eine Methode entwickelt werden, die möglichst sämtliche Komponenten eines in geringer Menge verfügbaren Lipoidgemisches quantitativ zu erfassen gestattet. Die Adsorptionsmethode, die ich wählte, ist bereits mehrfach auf dem Gebiet der Fett- und Lipoidanalyse angewandt worden (KUHN, KAUFMANN, WINTERSTEIN, WINDAUS, WAGNER-JAUREGG, THALER, WIELAND, KARRER, HÜTTEL), doch wurden in diesen früheren Arbeiten nur einige wenige Verbindungen adsorptiv abgetrennt, die zuvor durch andere Methoden aus einem komplizierten Fett- und Lipoidgemisch isoliert worden waren. Bei dieser Isolierung hatte außerdem der weitaus größte Teil des Gemisches Veränderungen erfahren, war also für eine weitere Analyse nicht geeignet.

W. TRAPPE hat als Erster systematisch unter definierten Bedingungen das Verhalten der einzelnen Fettstoffe bei der Adsorption in Abhängigkeit von dem Adsorbens und dem Lösungsmittel untersucht. Er fand folgende, von der Natur des Adsorbens und des Adsorbendums unabhängige Reihe von Lösungsmitteln mit abnehmender Elutionskraft: Methanol, Aethanol, n-Propanol, Aceton, essigsäures Aethyl, Aethyläther, Chloroform, Methylenchlorid, Benzol, Toluol, Trichloräthylen, Tetrachlorkohlenstoff, Cyclohexan, Petroläther. Die von ihm gleichfalls unter definierten Bedingungen festgestellte Adsorbilität verschiedener Fettstoffe, die als Bestandteile von Gesamtlipoidextrakten aus biologischem Material in Frage kommen, ergab unabhängig von der Natur des angewandten Adsorbens und Lösungsmittels folgende Reihe steigender Adsorbilität: Acyclische Kohlenwasserstoffe, Cholesterinester, Triglyceride, freies Cholesterin, freie Fettsäuren, Phosphatide. Danach ist es prinzipiell möglich, durch Anwendung von Adsorptionssäulen nach dem Prinzip der flüssigen Chromatogramme einzelne Lipoidfraktionen quantitativ zu isolieren. Aber TRAPPE gelang diese Trennung nicht zur vollen Zufriedenheit, auch mußte er feststellen, daß auf einer Säule aus Aluminiumoxyd eine teilweise Verseifung von Triglyceriden stattfindet, und die freien Fettsäuren und Phosphatide ließen sich mit organischen Lösungsmitteln überhaupt nicht eluieren. Von natürlichen Lipoidgemischen des tierischen Organismus untersuchte TRAPPE nur die Serum-, Leber- und Nierenlipoiden, beschränkte sich aber auch hierbei im wesentlichen auf die Abtrennung der Kohlenwasserstofffraktion und der Cholesterinesterfraktion bzw. auf die Gewinnung eines fettsäure- und phosphatidfreien Eluates.

In meinen Untersuchungen trat als weitere Komplikation die Anwesenheit von lipidlöslichen Farbstoffen auf, die ebenfalls nach dem Adsorptionsverfahren abgetrennt werden sollten. In den Ätherextrakten aus den Mikroorganismen (Näheres siehe S. 617/618) war mit der Anwesenheit folgender Stoffgruppen zu rechnen: I. acyclische Kohlenwasserstoffe, II. Wachse, III. Sterinester, IV. Triglyceride, V. freie Sterine, VI. freie Fettsäuren, VII. Phosphatide, VIII. lipidlösliche Pflanzenfarbstoffe und IX. ätherische Öle.

Während von den neun Gruppen die Gruppen I—VIII jede für sich eine etwa einheitliche Stoffgruppe darstellen, umfaßt die Gruppe der ätherischen Öle zahlreiche Verbindungen der verschiedensten Stoffe. Diese gehören teils der acyclischen, teils der isocyclischen Reihe an. Außer den zahlreichen Kohlenwasserstoffen, namentlich Terpenen, finden sich darin Alkohole, Aldehyde, Ketone, Säuren, Ester, Phenole und Phenoläther, seltener auch Basen, Sulfide, Nitrile, Senföle usw. Wegen der vielfältigen chemischen Zusammensetzung der ätherischen Öle und wegen ihrer vermutlich geringen Menge im Ätherextrakt hielt ich es für ratsam, sie in einem getrennten Arbeitsgang zu erfassen und zwar mit Hilfe der Wasserdampfdestillation. Solange man den chemischen Charakter des ätherischen Öles nicht kennt, kann man auch nicht ahnen, wo man es nach der Adsorption auf der Säule finden wird.

In einer Reihe von Modellversuchen prüfte ich zunächst aus jeder der oben aufgeführten Stoffgruppen eine oder auch mehrere Substanzen auf ihr Verhalten bei der Adsorption an Aluminiumoxyd, welches auch TRAPPE neben Siliciumdioxid und einigen Erden verwandt hatte, und Saccharose, sowie bei nachfolgender Elution. Die Saccharose kam zur Anwendung, weil sich die Chlorophylle bei der Adsorption an Aluminiumoxyd zersetzen [WINTERSTEIN (b)]. Bei den Modellversuchen wurden herangezogen: I. als Vertreter der acyclischen Kohlenwasserstoffe: Ceten und Paraffinöl; II. als Vertreter der Wachse: Walrat; III. als Cholesterinester: Cholesterylstearat; IV. als Triglycerid: Tributyrin; V. als freies Sterin: Cholesterin; VI. als Vertreter der freien Fettsäuren: Valeriansäure und Stearinsäure; VII. als Phosphatid das Lecithin. Das Lecithin wurde in Petroläther/Benzol 14:1 gelöst, alle übrigen Verbindungen nur in Petroläther.

Reinigung der organischen Lösungsmittel.

Bei den neuerlich wieder zugänglichen analysenreinen Präparaten von Petroläther, Benzol und Methanol sind besondere Reinigungsverfahren im allgemeinen nicht erforderlich; dagegen sind sie bei analysenreinem Äther und Tetrachlorkohlenstoff nötig.

1. Äther. Käuflicher Äther wurde fünfmal mit Wasser (auf 1 Liter Äther 100 ccm Wasser) zur Entfernung des Äthanols gewaschen. Dann versetzt man den Äther mit einer 10%igen Eisen II-Sulfatlösung, die mit wenig Schwefelsäure angesäuert wird (auf 1 Liter Äther 100 ccm Eisensulfatlösung) und schüttelt zwei Stunden auf der Schüttelmaschine. Die Eisensulfatlösung wird im Scheidetrichter abgetrennt, der Äther einmal mit wenig Wasser gewaschen und mit einer 10%igen Chromsäurelösung 15 Minuten lang ge-

geschüttelt (auf 1 Liter Äther 50 ccm Chromsäurelösung). Daraufhin wird die Chromsäurelösung abgetrennt und der Äther mit 100 ccm einer 5%igen Soda-Lösung gewaschen, anschließend solange mit Wasser, bis bei Zusatz von 0.1 ccm 1%iger alkoholischer Phenolphthaleinlösung keine Rotfärbung mehr im Washwasser auftritt. Man filtriert den Äther durch ein trockenes Faltenfilter und trocknet ihn 24 Stunden über geglühtem Calciumchlorid. Dann wird destilliert. Siedepunkt 34.5°. Es ist gut, sich zu überzeugen, ob der so gereinigte Äther peroxyd- und aldehydfrei ist. Sind nämlich die Aldehyde durch die Chromsäure nicht vollständig oxydiert, so bilden sich in kurzer Zeit wiederum Peroxyde (RIECHE). Bei kurzem Schütteln einer Ätherprobe mit wenigen Kubikzentimetern einer Lösung von fuchsin-schwefeliger Säure darf keine Rotfärbung auftreten; geringe Mengen Aldehyde geben schon eine stark positive Reaktion. Um zu prüfen, ob der Äther peroxydfrei ist, versetzt man wenige Tropfen Äther mit 4 ccm einer kalt gesättigten wässrigen Lösung von Benzidin mit 5 ccm gesättigter Kochsalzlösung und einigen Tropfen einer äußerst verdünnten Eisen II-Sulfatlösung (ein Körnchen Eisen II-Sulfat von Stecknadelkopfgröße in etwa 5 ccm Wasser gelöst). Sind Spuren von Peroxyden im Äther enthalten, so tritt nach wenigen Minuten eine deutliche Blaufärbung auf. Wenn der gereinigte Äther nicht sehr schnell verbraucht wird, kann man ihn so jederzeit auf seine Brauchbarkeit prüfen.

2. Tetrachlorkohlenstoff. Käuflicher Tetrachlorkohlenstoff wurde mit einer 50%igen Kaliumhydroxyd-Lösung und reinem Alkohol (auf 1 Liter Tetrachlorkohlenstoff 50 ccm Kalilauge und 75 ccm Alkohol) versetzt, das Ganze auf etwa 50° erwärmt und eine halbe Stunde lang auf der Schüttelmaschine geschüttelt. Man trennt die alkoholische Lauge ab, wäscht den Tetrachlorkohlenstoff einmal mit Wasser und filtriert ihn durch ein trockenes Faltenfilter. Der gesamte Prozeß wird zweimal wiederholt. Dann wäscht man solange mit Wasser, bis das Washwasser alkalifrei ist (Prüfung mit Phenolphthaleinlösung). Der Tetrachlorkohlenstoff wird über Phosphorperoxyd sowohl getrocknet als auch destilliert. Siedepunkt 76.7°.

Technik der Adsorptionsversuche.

Von jeder der im Modellversuch zu prüfenden Substanzen wurden jeweils zwei etwa gleich stark konzentrierte Lösungen (40—100 mg eingewogener Substanz in 50 ccm Lösungsmittel) hergestellt. Von diesen Lösungen wurde die eine durch eine Adsorptionssäule aus 40 g Saccharose, die andere durch eine Adsorptionssäule aus 40 g Aluminiumoxyd filtriert.

Als Adsorptionsrohre wurden einfache zylindrische Glasrohre von 28 mm Durchmesser und 200 mm Höhe bzw. 35 mm Durchmesser und 350 mm Höhe benutzt. Die Rohre wurden in einen durchbohrten Gummistopfen gesteckt und in Glasfilternutschen (Schott und Gen. 3 G 3 und 11 G 3) eingeführt, so daß der untere Rand des Adsorptionsrohres auf der Filterplatte steht (siehe Abb. 1). Die Glasfilternutsche sitzt auf einem Wittschen Topf. Ehe das Adsorptionsmittel eingefüllt wird, gibt man zur Abdichtung des Rohres auf der Filterplatte etwas entfettete Watte in das Rohr.

Die Saccharose (käuflcher weißer kristallisierter Rohrzucker, in einer Porzellankugelmühle sehr fein gemahlen) wurde wegen Mangels an Petroläther nicht nach dem meist üblichen Verfahren in Petroläther

suspendiert, sondern in kleinen, nötigenfalls nochmals im Porzellanmörser zerriebenen Portionen von ungefähr 5 g in das Rohr gefüllt, wobei gleichzeitig an der Wasserstrahlpumpe gesaugt und die Saccharose mit einem Holzpistill gleichmäßig festgestampft wurde. Ist das Rohr gefüllt ($\frac{1}{3}$ bleibt frei zur Aufnahme der Lösung), so wurde auf die Saccharose noch etwas entfettete Watte gelegt, damit sie nicht beim Aufgießen der Lösung aufgewirbelt wird.



Abb. 1. Glasfilterrohr zum Adsorptionsversuch.

Das Aluminiumoxyd (käufliches Aluminiumoxyd, standardisiert nach BROCKMANN, Präparat RIEDEL DE HAEN) wurde zur Aktivierung in Portionen zu 15 g in Porzellantiegeln 15 Minuten mit dem Bunsenbrenner stark erhitzt. Für meine Versuche ließ ich es anschließend 12 Stunden an der Luft stehen, wobei es teilweise durch die Luftfeuchtigkeit entaktiviert wird. Es wurde trocken in Portionen von etwa 5 g in die Säule gegeben und unter Saugen an der Wasserstrahlpumpe mit einem Holzpistill festgestampft. Als Abschluß wurde hier ebenfalls etwas entfettete Watte darauf gelegt.

In den oberen Teil des so vorbereiteten Adsorptionsrohres wurde die Lösung mit der betreffenden Substanz eingefüllt, unter schwachem Saugen an der Wasserstrahlpumpe durch die Säule filtriert und das Filtrat in 50 ccm Erlenmeyerkolben als Vorlage aufgefangen. Die Vorlage wurde gewechselt, wenn der Erlenmeyerkolben zur Hälfte gefüllt, d. h. etwa 25 ccm durchfiltriert waren. Das Nachwaschen erfolgte stets mit dem gleichen Lösungsmittel bzw. Lösungsmittelgemisch. Die Filtrationsdauer von je 25 ccm betrug bei Anwendung der Saccharose-Säule 10—15 Minuten, bei Anwendung der Aluminiumoxyd-Säule 1—2 Minuten. Das Lösungsmittel des Filtrats wurde in den Erlenmeyerkolben sofort auf dem Wasserbad verdampft und der Rückstand 24 Stunden im evakuierten Exsikkator über konzentrierter Schwefelsäure und Paraffinschnitzeln getrocknet. Das Nachwaschen mit dem gleichen Lösungsmittel erfolgte so lange, bis das letztgewonnene Filtrat nach dem Verdampfen keinen Rückstand mehr enthielt. War die Summe aller Rückstände gleich dem Gewicht der gelösten Substanz, so war erwiesen, daß von der Substanz nichts an das Adsorptionsmittel adsorbiert wurde. Wurde aber die gelöste Substanz trotz Nachwaschens mit großen Mengen des Lösungsmittels von dem Adsorptionsmittel festgehalten, so kamen in meinen Versuchen der Reihe nach folgende Elutionsmittel zur Anwendung: Tetrachlorkohlenstoff, Benzol, Äther, Äther-Methanol 19:1, Methanol. Meistens gelang es, durch eines dieser Lösungsmittel die adsorbierte Substanz zu eluieren. Einige der von mir angewandten Modellsubstanzen wurden durch den Adsorptionsversuch in mehrere Komponenten zerlegt, die verschiedene chemische Eigenschaften besaßen. Daraus war zu schließen, daß diese Modellsubstanzen durch andere Verbindungen verunreinigt oder in der Säule verändert waren.

Ergebnis der Modellversuche.

I. Versuche mit acyclischen Kohlenwasserstoffen:

Versuch I A:

Säule aus je 40 g Saccharose.

39.4 mg Ceten	46.7 mg Paraffinöl
gelöst in je 50 ccm Petroläther, nachgewaschen mit Petroläther.	
25 ccm: 37.9 mg	25 ccm: 42.1 mg
25 ccm: 1.0 mg	25 ccm: 4.9 mg
25 ccm: 0.0 mg	25 ccm: 0.0 mg
25 ccm: 0.0 mg	25 ccm: 0.0 mg
<u>38.9 mg</u>	<u>47.0 mg</u>

Versuch I B:

Säule aus je 40 g Aluminiumoxyd.

41.6 mg Ceten	53.7 mg Paraffinöl
gelöst in je 50 ccm Petroläther, nachgewaschen mit Petroläther.	
25 ccm: 38.8 mg	25 ccm: 45.1 mg
25 ccm: 2.3 mg	25 ccm: 7.6 mg
25 ccm: 0.0 mg	25 ccm: 0.6 mg
25 ccm: 0.0 mg	25 ccm: 0.0 mg
<u>41.1 mg</u>	<u>53.3 mg</u>

Ergebnis: Die Kohlenwasserstoffe aus Petroläther werden weder an Saccharose noch an Aluminiumoxyd adsorbiert.

II. Versuche mit einem Wachs:

Versuch II A:

Säule aus 40 g Saccharose.

73.2 mg Walrat,
gelöst in 50 ccm Petroläther,
nachgewaschen mit Petroläther

25 ccm: 69.4 mg
25 ccm: 3.7 mg
25 ccm: 0.0 mg
25 ccm: 0.0 mg
<u>73.1 mg</u>

Versuch II B:

Säule aus 40 g Aluminiumoxyd.

38.7 mg Walrat,
gelöst in 50 ccm Petroläther,
nachgewaschen mit Petroläther

25 ccm: 4.1 mg
25 ccm: 22.7 mg
25 ccm: 6.4 mg
25 ccm: 1.8 mg
25 ccm: 0.6 mg
25 ccm: 0.0 mg

eluiert mit Benzol

25 ccm: 1.6 mg
25 ccm: 0.5 mg
25 ccm: 0.0 mg

eluiert mit Äther

25 ccm: 0.6 mg
25 ccm: 0.0 mg
25 ccm: 0.0 mg
<u>38.3 mg</u>

Ergebnis: Die Wachse verhalten sich wie die Kohlenwasserstoffe. Der aus dem Aluminiumoxyd erst mit Benzol eluierbare geringe Anteil ist kein Wachs. Walrat (Cetylpalmitat) enthält neben reinem Wachs noch geringfügige Mengen anderer Stoffe, hauptsächlich Triglyceride.

III. Versuche mit einem Sterinester:

Versuch III A:

Säule aus 40 g Saccharose.

71.9 mg Cholesterylstearat,
gelöst in 50 ccm Petroläther,
nachgewaschen mit Petroläther

25 ccm: 65.2 mg
25 ccm: 6.6 mg
25 ccm: 0.0 mg
25 ccm: 0.0 mg

71.8 mg

Versuch III B:

Säule aus 40 g Aluminiumoxyd.

85.1 mg Cholesterylstearat,
gelöst in 50 ccm Petroläther,
nachgewaschen mit Petroläther

25 ccm: 0.0 mg
25 ccm: 0.0 mg
25 ccm: 0.0 mg
25 ccm: 0.0 mg

eluiert mit Tetrachlorkohlenstoff

25 ccm: 53.9 mg
25 ccm: 29.6 mg
25 ccm: 1.3 mg
25 ccm: 0.0 mg

84.8 mg

Ergebnis: Der Sterinester Cholesterylstearat wird von Saccharose nicht, wohl aber von Aluminiumoxyd aus Petroläther adsorbiert. Durch Tetrachlorkohlenstoff kann der Ester quantitativ eluiert werden.

IV. Versuche mit einem Triglycerid:

Versuch IV A:

Säule aus 40 g Saccharose.

80.2 mg Tributyrin,
gelöst in 50 ccm Petroläther,
nachgewaschen mit Petroläther

25 ccm: 75.1 mg
25 ccm: 5.7 mg
25 ccm: 0.0 mg
25 ccm: 0.0 mg

80.8 mg

Versuch IV B:

Säule aus 40 g Aluminiumoxyd.

109.7 mg Tributyrin, gelöst in 50 ccm Petroläther,
nachgewaschen mit Petroläther

25 ccm: 0.0 mg
25 ccm: 0.0 mg
25 ccm: 0.0 mg

nachgewaschen mit Tetrachlorkohlenstoff

25 ccm:	0.0 mg
25 ccm:	0.0 mg
25 ccm:	0.0 mg

eluiert mit Benzol

25 ccm:	15.5 mg
25 ccm:	41.6 mg
25 ccm:	12.1 mg
25 ccm:	3.2 mg
25 ccm:	0.0 mg

Verseifungszahlen

565.8
550.1
575.2
—
—

72.4 mg

72.4 mg

eluiert mit Äther

25 ccm:	13.2 mg
25 ccm:	12.4 mg
25 ccm:	2.1 mg
25 ccm:	0.0 mg
25 ccm:	0.0 mg

490.1
476.3
—
—
—

27.7 mg

27.7 mg

100.1 mg

Adsorbiert:

109.7 mg

Eluiert:

100.1 mg

nicht eluiert:

9.6 mg

Ergebnis: Während das Triglycerid Tributyrin sich an Saccharose nicht adsorbieren läßt, wird es von Aluminiumoxyd adsorbiert und läßt sich auch durch Tetrachlorkohlenstoff nicht herauslösen. Erst mit Benzol wird der größere Teil des Tributyrins eluiert, während der übrige Teil sich nicht mit Benzol eluieren läßt, auch wenn man noch so oft nachwäscht. Benutzt man dann Äther als Elutionsmittel, so wird ein weiterer Teil bis auf einen geringen Rest herausgelöst. Der geringe Rest läßt sich aber mit keinem Elutionsmittel, auch nicht mit Methanol, eluieren.

TRAPPE (b) hat in seiner Arbeit festgestellt, daß der unter diesen Bedingungen nicht eluierbare Anteil aus freien Fettsäuren besteht. Er vermutet daher, daß der mit Äther eluierbare Anteil aus Mono- bzw. Diglyceriden besteht. Um dies nachzuweisen bestimmte ich die Verseifungszahlen¹ der mit Benzol und Äther eluierten Hauptanteile und des zum Versuch benutzten Tributyrins. Dabei zeigte sich eindeutig, daß das mit Benzol eluierte Tributyrin keine Veränderung erfahren hatte; die von mir in dem verwandten Tributyrin mit 553.8 ermittelte Verseifungszahl stimmt mit der in den Rückständen der Benzoleluate

¹ Da in meinen Versuchen jeweils nur geringe Triglyceridmengen zur Verfügung standen, war die Bestimmung der Verseifungszahl schwierig. Durch sorgfältige Einhaltung bestimmter Bedingungen bei der Ermittlung der Verseifungszahl gelang es, den Fehler unter $\pm 5\%$ zu drücken und dadurch mittels dieser Methode die Länge der Fettsäurekette in etwa zu ermitteln.

gefundenen praktisch überein. Aber in dem Rückstand des Äthereluates betrug die Verseifungszahl nur 490.1 und 476.3, woraus zu schließen ist, daß dieser Anteil aus Dibutyryl besteht. Diesen 27.7 mg Rückstand des Äthereluates entsprechen 10.5 mg Buttersäure, d. h. diese Menge Buttersäure würde bei der Bildung von 27.7 mg Dibutyryl aus Tributyrin frei werden. Diese Menge stimmt auch ungefähr mit dem überhaupt nicht eluierten Anteil von 9.6 mg überein, so daß durch diesen Versuch die teilweise Spaltung des Triglycerides bei der Adsorption an Aluminiumoxyd sehr wahrscheinlich gemacht, fast bewiesen ist.

V. Versuche mit freiem Sterin:

Versuch V A:

Säule aus 40 g Saccharose.
60.5 mg Cholesterin,
gelöst in 50 ccm Petroläther,
nachgewaschen mit Petroläther

25 ccm: 59.6 mg
25 ccm: 1.4 mg
25 ccm: 0.0 mg
25 ccm: 0.0 mg

61.0 mg

Versuch V B:

Säule aus 40 g Aluminiumoxyd.
68.3 mg Cholesterin,
gelöst in 50 ccm Petroläther,
nachgewaschen mit Petroläther

25 ccm: 0.0 mg
25 ccm: 0.0 mg
25 ccm: 0.0 mg

nachgewaschen mit
Tetrachlorkohlenstoff

25 ccm: 0.0 mg
25 ccm: 0.0 mg
25 ccm: 0.0 mg

nachgewaschen mit Benzol

25 ccm: 0.0 mg
25 ccm: 0.0 mg
25 ccm: 0.0 mg

eluiert mit Äther

25 ccm: 43.8 mg
25 ccm: 21.6 mg
25 ccm: 2.3 mg
25 ccm: 0.0 mg
25 ccm: 0.0 mg

67.7 mg

Ergebnis: Cholesterin als freies Sterin wird aus Petroläther an Saccharose nicht, wohl aber an Aluminiumoxyd adsorbiert. Daraus ist es weder mit Tetrachlorkohlenstoff noch mit Benzol, sondern erst mit Äther eluierbar.

VI. Versuche mit freien Fettsäuren:

Versuch VI A:

Säule aus je 40 g Saccharose.

57.6 mg Valeriansäure

51.2 mg Stearinsäure

gelöst in je 50 ccm Petroläther,
nachgewaschen mit Petroläther

25 ccm: 38.4 mg
 25 ccm: 17.3 mg
 25 ccm: 2.2 mg
 25 ccm: 0.0 mg
 25 ccm: 0.0 mg
 25 ccm: 0.0 mg
57.9 mg

25 ccm: 18.5 mg
 25 ccm: 27.7 mg
 25 ccm: 4.9 mg
 25 ccm: 0.0 mg
 25 ccm: 0.0 mg
 25 ccm: 0.0 mg
51.1 mg

Versuch VI B:

Säule aus je 40 g Aluminiumoxyd.

49.8 mg Valeriansäure

64.1 mg Stearinsäure

gelöst in je 50 ccm Petroläther.

Weder durch Nachwaschen mit Petroläther noch mit Tetrachlorkohlenstoff, Benzol, Äther und Äther/Methanol = 19:1 (jeweils dreimal 25 ccm) ließ sich die freie Fettsäure in wägbarer Menge eluieren.

Ergebnis: Die freien Fettsäuren werden von Aluminiumoxyd so stark adsorbiert, daß sie durch die oben genannten Lösungsmittel nicht eluiert werden können. Von der Saccharose hingegen werden die freien Fettsäuren aus Petroläther nicht adsorbiert.

VII. Versuche mit Phosphatid:

Versuch VII A:

Säule aus 40 g Saccharose.

63.4 mg Lecithin (Schering),

gelöst in 50 ccm Petroläther/Benzol 14:1,

nachgewaschen mit Petroläther/Benzol 14:1

25 ccm: 34.7 mg
 25 ccm: 0.4 mg
 25 ccm: 0.0 mg
 25 ccm: 0.0 mg
35.1 mg

35.1 mg = 55.4 % (enthalten keinen Phosphor)

eluert mit Äther

25 ccm: 0.6 mg
 25 ccm: 0.0 mg
 25 ccm: 0.3 mg
0.9 mg

eluert mit Methanol

25 ccm: 256 mg
 25 ccm: 216 mg
 25 ccm: 199 mg
 25 ccm: 221 mg
892 mg

Versuch VII B:

Säule aus 40 g Aluminiumoxyd.

76.0 mg Lecithin (Schering),

gelöst in 50 ccm Petroläther/Benzol 14:1,

nachgewaschen mit Petroläther/Benzol 14:1

25 ccm:	8.6 mg	
25 ccm:	6.1 mg	
25 ccm:	4.0 mg	
25 ccm:	0.3 mg	
	<u>19.0 mg</u>	19.0 mg = 25.0 % (enthalten keinen Phosphor)
eluiert mit Äther		
25 ccm:	0.6 mg	} Cholesterinkristalle
25 ccm:	1.8 mg	
25 ccm:	1.4 mg	
25 ccm:	1.2 mg	
25 ccm:	0.0 mg	
	<u>5.0 mg</u>	5.0 mg = 6.6 % (enthalten keinen Phosphor)
		<u>24.0 mg = 31.6 %</u>

Ergebnis: Für diese Phosphatidversuche wurde das Lecithinpräparat der Firma Schering benutzt, ein Handelsprodukt, das nicht nur aus dem Phosphatid Lecithin besteht, sondern noch andere Fettbestandteile enthält; denn der Phosphorgehalt verschiedener Lecithine beträgt nach Literaturangaben 3.8—4.3 %, den Phosphorgehalt des von mir benutzten Lecithins ermittelte ich aber nur zu 1.9 %². In Übereinstimmung damit wurden in dem unter Verwendung von Saccharose als Adsorptionsmittel durchgeführten *Versuch VII A* die nicht adsorbierten 35.1 mg = 55.4 % der verwandten „Lecithinmenge“ phosphorfrei gefunden. Das Phosphatid als solches, nämlich die Differenz der verwandten abzüglich der nicht adsorbierten Lecithinmenge, also 28.3 mg = 44.6 % war adsorbiert und wurde vermutlich erst mit Methanol eluiert. Denn in der mit Methanol eluierten großen Substanzmenge von 892 mg, die im wesentlichen aus Saccharose bestand, da Saccharose in geringer Menge in Methanol löslich ist, fanden sich nach Veraschung 1.189 mg P. Diese auf die 28.3 mg adsorbierte Substanz berechnet ergeben einen Prozentgehalt von 4.2 %, einen Wert, der mit den in der Literatur angegebenen P-Werten für Lecithin gut übereinstimmt.

In dem unter Verwendung von Aluminiumoxyd als Adsorptionsmittel durchgeführten *Versuch VII B* waren 19.0 mg nicht adsorbierter und 5.0 mg mit Äther eluierter Substanz, insgesamt 24.0 mg = 31.6 % P-frei. Die 5 mg mit Äther eluierter Substanz bestanden aus Cholesterin. Nicht eluiert wurden 52.0 mg = 68.4 %. Unter Zugrundelegung des Ergebnisses von Versuch VII A mit Saccharose, demzufolge in dem Schering-Lecithin nur 44.6 % Phosphatid enthalten sind, könnten in den in Versuch VII B verwandten 76.0 mg Schering-Lecithin nur 33.9 mg Phosphatid enthalten sein, die sicher noch nicht eluiert waren, also

² Zur Bestimmung des Phosphatidphosphors wurde ein eingewogener Anteil des Phosphatids im Kjeldahlkolben mit konzentrierter Schwefelsäure und Perhydrol p. a. verascht und in der Aschenlösung P kolorimetrisch nach LOHMANN und JENDRASSIK mit dem Pulfrichstufenphotometer bestimmt.

in den 52.0 mg noch adsorbierter Substanz enthalten sind. Die Differenz 52.0 mg — 33.9 mg, also 18.1 mg = 23.8 % bestehen auf Grund der Erfahrungen in den Versuchen mit freien Fettsäuren wahrscheinlich aus freien Fettsäuren. Demnach hätte das von mir verwandte Handelspräparat Lecithin der Firma Schering folgende Zusammensetzung:

44.6 %	Phosphatid
23.8 %	freie Fettsäuren
6.6 %	Cholesterin
25.0 %	Triglyceride
<hr/>	
100.0 %	

Diese Feststellung der prozentualen Zusammensetzung des Präparates war wichtig, da es noch für einen weiteren Modell-Adsorptions-Versuch benutzt wurde.

Aus den bisherigen Modellversuchen ergibt sich also, daß — in Bestätigung der Ergebnisse von TRAPPE — die freien Fettsäuren und die Phosphatide von Aluminiumoxyd sehr stark adsorbiert werden und sich mit den von mir verwandten Lösungsmitteln allein nicht eluieren lassen. Ferner zeigte sich in meinen Versuchen, daß die freien Fettsäuren aus petrolätherischer Lösung von Saccharose nicht adsorbiert werden, wohl aber die Phosphatide, und daß letztere nur mit Methanol quantitativ von der Saccharose eluierbar sind. Da Chlorophylle, Phaeophytine und sauerstoffhaltige Carotinoide ebenfalls von Saccharose aus einer Lösung von Petroläther/Benzol 14:1 adsorbiert werden, prüfte ich, welchen Platz das Phosphatid bei der Adsorption auf einer solchen Säule einnimmt. Zu diesem Zweck stellte ich mir nach einer im GATTERMANN-WIELAND angegebenen Vorschrift aus Spinatblättern einen Farbstoffextrakt her, der im wesentlichen die Chlorophylle Phaeophytine und Carotinoide enthält. Diese Petroläther und Benzol enthaltende Farbstofflösung filtrierte ich durch eine Saccharosesäule und fand auf der Säule, wie bekannt, von oben nach unten folgende Zonen: Chlorophyll b (gelb-grün), Chlorophyll a (blau-grün), Xanthophyll (gelb), Phaeophytin b (gelb bis olivfarben), Phaeophytin a (hellgrau). Chlorophyll b wird also am stärksten adsorbiert und im obersten Teil der Säule festgehalten, während die Carotine α , β und γ und die Xanthophyllester nicht adsorbiert werden und ins Filtrat gehen. Durch die so präparierte, zur Entwicklung des Chromatogramms mit Petroläther/Benzol 14:1 nachgewaschene Säule filtrierte ich eine Lösung von Lecithin in Petroläther/Benzol 14:1. Beim Durchfiltrieren dieser Lösung wurden allmählich alle Farbstoffzonen auf der Säule ein Stück weiter nach unten verdrängt, über der Chlorophyll b Zone zeigte sich eine neue farblose Zone, in der ich das Phosphatid vermutete. Beim Nachwaschen mit Petroläther/Benzol 14:1 änderte sich das Bild auf der Säule nicht. Sämtliche Zonen, auch die farblose Zone, wurden abgegraben und die adsorbierten Verbindungen einzeln mit Methanol aus der Saccharose herausgelöst. Nach Verdampfen des Lösungsmittels

wurden die Rückstände feucht verascht und in der Asche jeweils der Phosphorgehalt nach LOHMANN und JENDRASSIK kolorimetrisch bestimmt. Dabei stellte sich heraus, daß nur die aus der obersten farblosen Zone herausgelöste Substanz Phosphor enthielt, die aus den Farbstoffzonen herausgelösten Substanzen phosphorfrei waren.

Nach diesen Modellversuchen mit den einzelnen Stoffen bzw. Stoffgruppen bezüglich ihres Verhaltens bei der Adsorption und Elution führte ich noch Modellversuche durch an einem Gemisch, das aus jeder Stoffgruppe eine Verbindung, bei den Farbstoffen mehrere, enthielt. Einen dieser Modellversuche bringe ich als Beispiel, in dem das Gemisch folgendermaßen zusammengesetzt war:

Ceten	29.0 mg
Walrat (Cetylpalmitat)	22.2 mg
Cholesterylstearat	30.6 mg
Tributyryn	113.5 mg
Cholesterin	19.6 mg
Cholesterin (aus Lecithin)	2.1 mg
Stearinsäure	32.7 mg
freie Fettsäure (aus Lecithin)	7.5 mg
Lecithin (Phosphatid)	14.0 mg
Pflanzenfarbstoffe ³	15.3 mg
Triglyceride (aus Walrat und Lecithin)	9.8 mg
	<hr/> 296.3 mg

Dieses Gemisch löste ich in 100 ccm Petroläther/Benzol 14:1 und filtrierte die Lösung durch eine Säule aus 300 g Saccharose. Das Nachwaschen erfolgte mit 100 ccm Petroläther/Benzol 14:1, dann mit 100 ccm Petroläther. Jeweils 50 ccm Filtrat wurden in 100 ccm Erlenmeyerkolben aufgefangen. Diese enthielten nach Verdampfung des Lösungsmittels folgende Substanzmengen:

1. Filtrat	252.3 mg
2. Filtrat	8.1 mg
3. Filtrat	4.5 mg
4. Filtrat	0.5 mg
5. Filtrat	0.4 mg
	<hr/> 265.8 mg

Da die letzten beiden Filtrate praktisch kaum noch einen Rückstand enthielten, wurde das Filtrieren nicht mehr fortgesetzt. Die Bilanz ist folgende:

Ausgangsmenge:	296.3 mg
Im Filtrat 1—5:	<u>265.8 mg</u>
adsorbiert:	30.5 mg

Zu erwarten war, daß 14.0 mg Phosphatid
15.3 mg Pflanzenfarbstoffe

29.3 mg adsorbiert wurden. Die Menge der nicht an Saccharose adsorbierbaren α , β und γ Carotine und der Xan-

³ Wie oben angegeben aus Spinatblättern hergestellt.

nophyllester war mit 0.5 mg (s. Seite 617) so gering, daß sie praktisch vernachlässigt werden konnte.

auf der Säule waren folgende Zonen zu beobachten:

1. Zone, fast farblos, leicht grün gefärbt (oberste Zone)
2. Zone, gelb-grün
3. Zone, blau-grün
4. Zone, gelb
5. Zone, hellgelb bis olivfarben
6. Zone, hellgrau
7. Zone, farblos.

Die oberste Zone wurde abgegraben, mit Methanol eluiert, dieses verdampft und der Rückstand feucht verascht. Der Phosphorgehalt der Asche betrug 610 γ. Dem entsprechen 14.5 mg Phosphatid bei einem P-Gehalt von 4.2 Prozent.

Die Elution der adsorbierten Farbstoffe erfolgte mit Äther/Aceton 1:1. Der Rückstand der gesamten Farbstoff-Eluate betrug 19,1 mg. Das Gewicht sämtlicher eluierten Substanzmengen beträgt demnach:

Filtratrückstände 1—5	265.8 mg
Farbstoffe	19.1 mg
Phosphatid (berechnet aus der P-Analyse)	14.5 mg
	<u>299.4 mg</u> (Ausgangsmenge 296.3 mg).

Der Gesamtrückstand der Filtrate 1—5 vom Gewicht 265.8 mg wurde anschließend in 50 ccm Petroläther gelöst und die Lösung durch eine Säule aus 100 g Aluminiumoxyd filtriert. Die Elution der adsorbierten Verbindungen erfolgte wie bei den vorigen Versuchen mit Tetrachlorkohlenstoff, Benzol und Äther.

Säule aus 100 g Aluminiumoxyd.

265.8 mg Substanz (Filtrate 1—5),
gelöst in 50 ccm Petroläther

nachgewaschen mit Petroläther	Verseifungszahlen
1. 25 ccm: 16.6 mg (flüssig)	0.0
2. 25 ccm: 11.7 mg (flüssig)	0.9
3. 25 ccm: 5.1 mg (halbfest)	—
4. 25 ccm: 16.6 mg (fest)	110.7
5. 25 ccm: 1.5 mg (fest)	—
6. 25 ccm: 0.6 mg	—
52.1 mg	52.1 mg
eluiert mit Tetrachlorkohlenstoff	Verseifungszahlen
7. 25 ccm: 19.3 mg (fest)	84.4
8. 25 ccm: 9.7 mg (fest)	—
9. 25 ccm: 0.8 mg	—
10. 25 ccm: 0.5 mg	—
30.3 mg	30.3 mg

eluiert mit Benzol		Verseifungszahlen
11.	25 ccm: 35.4 mg (flüssig)	545.4
12.	25 ccm: 29.3 mg (flüssig)	553.9
13.	25 ccm: 13.1 mg (flüssig)	544.9
14.	25 ccm: 4.2 mg (flüssig)	—
15.	25 ccm: 3.9 mg (flüssig)	—
16.	25 ccm: 4.5 mg (flüssig)	—
17.	25 ccm: 2.8 mg	—
18.	25 ccm: 1.6 mg	—
19.	25 ccm: 1.5 mg	—
20.	25 ccm: 1.0 mg	—
21.	25 ccm: 0.8 mg	—
<u>98.1 mg</u>		98.1 mg
eluiert mit Äther		Verseifungszahlen
22.	25 ccm: 18.1 mg (fest)	1.9
23.	25 ccm: 2.1 mg (fest)	—
24.	25 ccm: 0.0 mg	—
25.	25 ccm: 17.6 mg (halbfest)	479.1
26.	25 ccm: 0.0 mg	—
27.	25 ccm: 0.0 mg	—
<u>37.8 mg</u>		37.8 mg
		<u>218.3 mg</u>

Bilanz:

Substanz	265.8 mg
Stearinsäure	— 32.7 mg
freie Fettsäuren	— 7.5 mg
Eluat (zu erwartender Wert)	225.6 mg
Eluat (gefundener Wert)	<u>218.3 mg</u>
Verlust	7.3 mg (abgespaltene Buttersäure!)
17.6 mg Dibutyryn =	6.7 mg Buttersäure.

Wie das Ergebnis zeigt, ist das Gesamtgewicht der Eluatrückstände mit 218.3 mg kleiner als das Gesamtgewicht der verwandten Filtratrückstände 1—5. Dieser Verlust ist, wie später noch erörtert wird, durch die Nicht-Eluierbarkeit der freien Fettsäuren bedingt. Ceten als Vertreter der Kohlenwasserstoffe und Walrat als Vertreter der Wachse finden sich erwartungsgemäß in der Petrolätherfraktion wieder, u. zwar, wie sich aus den Verseifungszahlen ergibt, das Ceten in den beiden ersten Vorlagen, das Walrat hauptsächlich in der vierten Vorlage. Der Sterinester (30.6 mg Cholesterylstearat) ist im Tetrachlorkohlenstoff-Eluat enthalten, seine Verseifungszahl stimmt mit der von mir im Ausgangsmaterial ermittelten überein. In der Benzolfraction, die die gesamten Triglyceride (123.3 mg) enthalten sollte, sind Verluste eingetreten, und zwar durch die oben (Seite 609) erörterte Umwandlung von Triglyceriden in Diglyceride auf der Aluminiumoxydsäule. Die Diglyceride sind, wie aus dem Modellversuch IV B ersichtlich war, nicht mehr

mit Benzol, sondern erst mit Äther eluierbar. Diese Umwandlung des Triglycerids in ein Diglycerid zeigen auch die Verseifungszahlen an, die im Benzoleluat dem Tributyrin, in der vierten Vorlage des Äthereluates dem Dibutyrin entsprechen. In den beiden ersten Vorlagen des Äthereluates finden sich die freien Sterine wieder, die Verseifungszahl ist praktisch Null. An freien Fettsäuren waren in dem Ausgangsfettgemisch 32.7 mg Stearinsäure und 7.5 mg freie Fettsäuren aus Lecithin vorhanden. Bei der Umwandlung der im Benzoleluat nicht wieder gefundenen 25.2 mg Triglyceride (eingesetzt als Tributyrin) in Dibutyrin würden 19.4 mg Dibutyrin und 7.3 mg Buttersäure entstehen. Werden diese in die Bilanz eingesetzt, so ist sie praktisch ausgeglichen.

Auffallend war, daß beim Eluieren mit Benzol und Äther die Eluate gelb gefärbt waren. Neben den Triglyceriden, Diglyceriden und freien Sterinen werden nämlich auch die drei Carotine α , β und γ und die Xanthophyll-Ester eluiert. Um festzustellen, ob diese in so großer Menge vorhanden sind, daß sie die Bestimmung der Kennzahlen, der Verseifungszahlen und der in den späteren Versuchen (siehe Seite 622) bestimmten Jod- und Rhodanzahlen merklich stören können, habe ich ihre Menge in den Filtraten 1—5 der Saccharose-Säule bestimmt. Diese Bestimmung wurde nach KUHN und BROCKMANN kolorimetrisch mit der petrolätherischen Lösung vor der Adsorption an Aluminiumoxyd durchgeführt. Als kolorimetrischer Standard diente eine Lösung von 14.5 mg reinstem Azobenzol in 100 ccm 96%igem Äthanol. Diese Lösung ist farbgleich einer Lösung von 0.00235 mg α - oder β -Carotin. Für die Xanthophyll-Ester liegt der Wert ungefähr doppelt so hoch. Da ich für meine Zwecke nur ungefähr den Gehalt an diesen Carotinoiden bestimmen wollte und eine Trennung der Farbstoffe nicht vornahm, so setzte ich die Lösung von 14.5 mg Azobenzol in 100 ccm Alkohol gleich dem mittleren Wert von 0.0035 mg der genannten Carotinoide. Die Bestimmung wurde mit dem Autenrieth-Kolorimeter durchgeführt; ich fand einen Wert von 0.5 mg. Diese Menge stört die Bestimmung der Kennzahlen praktisch nicht.

Teil II. Untersuchung der Algenlipoide.

Die Algen wurden nicht von mir selbst, sondern in den Botanischen Anstalten nach den dort ausgearbeiteten Methoden (HARDER und v. WITSCH) kultiviert.

Chlorella und *Scenedesmus* wurden in zylindrischen, senkrecht stehenden Glasrohren von 60 mm Durchmesser und 1400 mm Höhe in einem normal temperierten Gewächshaus bei Tageslicht (etwa 5000—10 000 Lux) gezüchtet. Die Rohre enthielten als Nährlösung in 1000 ccm Leitungswasser 5.5 ccm 10%ige Kaliumnitratlösung, 0.4 ccm 10%ige Kaliumphosphatlösung (primär), 1 ccm 10%ige Magnesiumsulfatlösung, 1 ccm Eisenlaktatlösung (enthaltend 5.8 mg Eisenlaktat) und 10—20 ccm Erdabkochung. Durch die Rohre wurde von unten Luft eingeblasen, um die Zellen mit Kohlendioxyd und Sauerstoff zu versorgen. Dabei wurden gleichzeitig die Zellen aufgewirbelt und gleichmäßig über das ganze Rohr verteilt. *Nitzschia palca* wurde ebenfalls in durchlüfteten Glasrohren, aber in kleineren (30 mm Durchmesser, 250 mm Höhe) und außerdem in der Dunkelkammer bei elektrischer Belichtung (3000 Lux, gewöhnliche Glühbirne) kultiviert. Die Zusammensetzung der

Nährlösung war etwas anders, nämlich in 1000 ccm Leitungswasser 0.5 ccm einer 10%igen Natriumnitratlösung, 0.5 ccm einer 25%igen Natriumphosphatlösung (sekundär), 0.5 g Natriumsilikat und 100 ccm Erddekot.

Bei der Ernte der Algen wurde kein Wert darauf gelegt, daß die Kulturen maximale Fettanreicherung hatten. Jedoch wurden niemals ganz junge, noch in intensiver Vermehrung begriffene Kulturen verwendet, da diese sehr wenig Fett enthalten, sondern nur ältere, bei denen bereits eine deutliche Fettspeicherung eingesetzt hatte. Die Ernte der Algen fand stets am Vormittag statt. Der Inhalt der Rohre wurde dazu in große flache Schalen entleert und die bis zum nächsten Morgen sedimentierten Zellen nach Abgießen der überstehenden klaren Nährlösung in Zentrifugengläser überführt. Die durch scharfes Zentrifugieren von der restlichen Nährlösung abgetrennten Algenzellen kamen in eine dickwandige, mit Gummistopfen verschlossene Steilbrustflasche von 300 ccm Inhalt. Die Flasche wurde in ein kaltes Wasserbad eingetaucht, das Wasser im Bad langsam zum Kochen gebracht und die Flasche gleichzeitig mit der Wasserstrahlpumpe evakuiert. Während dieser Trocknung wurde Kohlendioxyd, das in einer Waschflasche mit Wasser gewaschen und in einem Trockenturm mit Calciumchlorid getrocknet war, zur Verdrängung des Luftsauerstoffes durch eine Kapillare in die Flasche eingeleitet. In fünf Stunden sind nach diesem Verfahren die Zellen trocken.

Die getrockneten Zellen wurden mit grobem Quarzsand (Präparat Merck) möglichst fein zerrieben und im Soxleth-Apparat mit Äther extrahiert. Auch während dieser Extraktion wurde durch ein seitlich in den Kolben eingeschmolzenes Rohr Kohlendioxyd (gewaschen und getrocknet wie oben) eingeleitet und somit der Luftsauerstoff aus dem Soxleth-Apparat verdrängt. Nach 24 Stunden ist die Extraktion praktisch beendet. Der Äther wurde abgedampft und der Rückstand gewogen. Er war bei allen drei Algen dunkelgrün gefärbt und von ölartiger Konsistenz. Er wurde in Benzol gelöst und mit Petroläther verdünnt, so daß das Verhältnis Benzol/Petroläther 1:14 beträgt. Man verwendet am besten für 100 mg Substanz je 20 ccm Lösungsmittelgemisch. Die Lösung wurde wie in den Modellversuchen mit nicht zu großer Geschwindigkeit durch die Saccharosesäule gesaugt und die Filtrate in 100 ccm Erlenmeyerkolben aufgefangen. Der Gesamtrückstand dieser Filtrate wurde anschließend in Petroläther gelöst, diese Lösung durch eine Aluminiumoxydsäule filtriert und die Filtrate und Eluate in 50 ccm Erlenmeyerkolben aufgefangen.

Von den drei verschiedenen Algenextrakten wurden je drei Adsorptionsversuche durchgeführt. Die an *Chlorella* gewonnenen Analyseergebnisse sind in Tab. I zusammengestellt.

Bei der Filtration der Petroläther/Benzol-Lösung durch die Saccharosesäule wurden 80.1%, 81.8% und 83.5% der Lipoidfraktion nicht adsorbiert. Adsorbiert waren Phosphatide und Farbstoffe.

Die Menge der Phosphatide wurde durch die Bestimmung des P-Gehaltes im Eluat des obersten Teiles der Saccharosesäule entsprechend den auf S. 613 geschilderten Erfahrungen ermittelt. Sie war gering, betrug 1% und weniger der gesamten Lipoidmenge. Dies ist

nicht verwunderlich; denn aus der Literatur ist bekannt (VAGELER, REWALD, DIEMAIR), daß die vollständige Abtrennung der Phosphatide aus pflanzlichem Material sehr schwierig ist. Sicher ist bei meiner Ätherextraktion nur ein geringer Bruchteil der gesamten Phosphatide aus den getrockneten Algen extrahiert worden. Da ich aber nur die ätherlöslichen Lipide der Algen analysieren wollte, habe ich die ätherunlöslichen Phosphatidanteile nicht weiter berücksichtigt.

Die Farbstoffe wurden aus den Farbstoffzonen der Saccharose-säule gemeinsam mit Äther/Aceton 1 : 1 (siehe Seite 615) eluiert, ihre Mengen betrugen 11.5—15.5% der Gesamtlipide. Sie wurden keiner eingehenden Analyse unterzogen, da mir kein geeignetes Spektroskop zur Verfügung stand. In einem besonderen Versuch habe ich die Farbstoffzonen getrennt eluiert, die Chlorophylle a und b und die Phaeophytine a und b ließen sich spektroskopisch nachweisen. Die Wellenlängen-Einteilung des Spektroskopes reichte jedoch nicht aus, um die Carotinoidfarbstoffe zu unterscheiden.

Bei der Filtration durch die Aluminiumoxydsäule zeigte sich, daß der Anteil der Kohlenwasserstoffe und Wachse, d. h. der aus Petroläther an Aluminiumoxyd nicht adsorbierte Anteil der Lipide, bei Chlorella sehr gering ist. Er betrug in den einzelnen Kolben meist weniger als 1 mg, insgesamt nur 0.5% der Gesamtlipoidfraktion, und ist so gering, daß man diesen Betrag vielleicht als Wägefehler ansehen muß.

Die Menge der mit Tetrachlorkohlenstoff aus der Aluminiumoxyd-Säule eluierbaren Substanzen, zu denen auch die Sterinester gehören, betrug bei den Chlorellalipoiden im Durchschnitt 2.4%. Sicher handelt es sich aber hierbei nicht ausschließlich um Sterinester; denn bei der Verseifung dieses Rückstandes mit Natriumäthylat und nachfolgender Fällung mit Digitonin erhielt ich nur ungefähr 3 mg Digitonid. Berechnet man daraus die Menge des Sterins bzw. des Sterinesters, so erhält man ungefähr 0.8 mg bzw. 1.2 mg. Die Sterinester der Chlorellalipide sind demnach von Substanzen begleitet, die die gleiche Adsorptionsaffinität wie die Sterinester besitzen.

Die im Äthereluat befindlichen freien Sterine ließen sich in den Rückständen gut erkennen, da sie sich durch einen hohen Schmelzpunkt und gute Kristallisationsfähigkeit auszeichneten. Leider war ihre exakte Abtrennung von den Diglyceriden mit Hilfe der Adsorptionssäule und Ätherelution nicht möglich. Vermutlich läßt sich die Trennung besser durchführen, wenn die Adsorptionssäulen länger sind. Um die wirkliche Menge an Sterinen zu erfassen, wurde in den Rückständen die gravimetrische Digitoninfällung durchgeführt. Die Menge der freien Sterine betrug 0.2—0.4%.

Die Bestimmung der Sterinester und freien Sterine wurde folgendermaßen durchgeführt:

1. Die Sterinester wurden nach MÜHLBOCK und KAUFMANN mit Natriumäthylat verseift: zu je 10 mg Ester kamen 10 ccm Alkohol und etwa 300 mg metallisches Natrium. Dieses Gemisch wurde vier Stunden auf einem

Tabelle I. Analysenergebnisse, gewonnen an der Lipoidfraktion von *Chlorella*.

1. Adsorptionsversuch		2. Adsorptionsversuch		3. Adsorptionsversuch	
Ausgangsmenge: 1.50 g Trockensubstanz ergaben 407.5 mg (= 27.2%) ätherlöst. Lipoid		Ausgangsmenge: 1.50 g Trockensubstanz ergaben 400.7 mg (= 26.7%) ätherlöst. Lipoid		Ausgangsmenge: 2.00 g Trockensubstanz ergaben 580.6 mg (= 29.0%) ätherlöst. Lipoid	
407.5 mg = 100%		Säule aus 300 g Saccharose. 400.7 mg = 100%		580.6 mg = 100%	
gelöst in je 100 ccm Petroläther/Benzol 14:1, nachgewaschen mit Petroläther/Benzol 14:1.					
Filtrate: 1. 315.8 mg		302.9 mg		465.6 mg	
2. 4.0 mg		19.7 mg		11.3 mg	
3. 3.3 mg		2.5 mg		6.1 mg	
4. 2.2 mg		1.8 mg		1.4 mg	
5. 1.0 mg		0.8 mg		0.4 mg	
326.3 mg = 80.1%		327.7 mg = 81.8%		484.8 mg = 83.5%	
Phosphatide: 3.3 mg = 0.8%		4.2 mg = 1.0%		4.9 mg = 0.8%	
Farbstoffe: 53.1 mg = 13.0%		46.2 mg = 11.5%		90.0 mg = 15.5%	
382.7 mg = 93.9%		378.1 mg = 94.3%		579.7 mg = 99.8%	
		Säule aus 100 g Aluminiumoxyd, gelöst in je 100 ccm Petroläther, nachgewaschen mit Petroläther			
in % der zum Adsorptionsversuch verwandten 407.5 mg		in % der zum Adsorptionsversuch verwandten 400.7 mg		in % der zum Adsorptionsversuch verwandten 580.6 mg	
Filtr.: 1. 0.6 mg		0.7 mg		0.5 mg	
2. 0.7 mg		0.7 mg		1.7 mg	
3. 0.7 mg		0.4 mg		0.7 mg	
2.0 mg = 0.5%		1.8 mg = 0.5%		2.9 mg = 0.5%	

kochenden Wasserbad am Rückflußkühler erhitzt, danach mit Wasser verdünnt (auf je 10 ccm Alkohol 15 ccm Wasser) und viermal mit je 20 ccm Petroläther das freie Sterin ausgeschüttelt. Die petrolätherische Lösung wurde jedesmal durch dasselbe Faltenfilter filtriert und nach Abdampfen des Petroläthers das freie Sterin gewogen. Durch Verseifen von Cholesterylstearat überzeugte ich mich von der quantitativen Spaltung des Esters.

2. Die freien Sterine wurden als Digitonide gravimetrisch bestimmt. Dabei wurde das Sterin in 1 ccm 96%igem Alkohol gelöst (eventuell unter gelindem Erwärmen) und mit einer 1%igen Lösung von Digitonin in 90%igem Alkohol versetzt. Zu je 1 mg Sterin kamen 0.5 ccm Digitoninlösung. (Erhöht man die Menge der Digitoninlösung, so steigt die Menge des Digitonids über den theoretischen Wert an.) Aus dem Gewicht des Digitonids berechnete ich den Betrag des Sterins durch Multiplikation mit dem Faktor 0.25. (Der theoretische Faktor für Cholesterin wäre 0.2431, für Stigmasterin 0.2555. Da aber die genaue chemische Zusammensetzung der Sterine der untersuchten Algen nicht bekannt war, multiplizierte ich mit dem Faktor 0.25.)

Die im Benzoleluat befindlichen Triglyceride wurden, da sie in größerer Menge zur Verfügung standen, einer genaueren Analyse unterzogen. Ich bestimmte neben den Verseifungszahlen auch die Jod- und Rhodanzahlen. Da aber zur gleichzeitigen Bestimmung dieser drei Kennzahlen die Rückstände jedes einzelnen Eluates nicht ausreichten, wurde in den Benzoleluaten des ersten Adsorptionsversuches die Rhodanzahl (RhZ.), in denen des zweiten die Jodzahl (JZ.) und in denen des dritten die Verseifungszahl (VZ.) ermittelt.

Die Bestimmung der Jodzahl erfolgte nach der Vorschrift von H. P. KAUFMANN (1935, S. 23) an 10 bis 100 mg Fett in den als Vorlage benutzten 50 ccm Erlenmeyerkolben, die Bestimmung der Rhodanzahl ebenfalls nach H. P. KAUFMANN (1935, S. 73).

Die Verseifungszahlen waren bei den Chlorellatriglyceriden unter Berücksichtigung der Fehlerbreite der Methode in den untersuchten sechs aufeinanderfolgenden Eluaten gleich, während die Jod- bzw. Rhodanzahlen bei fortschreitender Elution anstiegen. Die Rhodanzahlen waren immer niedriger als die Jodzahlen. Diese Tatsachen unterstützen die Theorie, daß Verbindungen um so stärker adsorbiert bzw. um so schwerer eluiert werden, je ungesättigter sie sind. Die gefundenen Jod- und Rhodanzahlen bewiesen, daß nicht nur einfach ungesättigte, sondern auch mehrfach ungesättigte Fettsäuren in den Triglyceriden enthalten sind. Da die Verseifungszahlen nicht anstiegen und ungefähr den Wert für Tristearin besaßen, darf man annehmen, daß es sich um Triglyceride handelt, deren Fettsäuren die durchschnittliche C-Atomzahl 18 besitzen. In anderen hier nicht beschriebenen Versuchen an Chlorellalipoiden ergab die Bestimmung der Verseifungszahl der mit Äther eluierten Diglyceride ungefähr den Wert für Distearin; die beiden Fettsäuren der Diglyceride besaßen also im Mittel ebenfalls 18 C-Atome. Die Rhodan- und Jodzahlen der Chlorellatriglyceride stiegen von 63.8 bzw. 93.1 im Rückstand des ersten Eluates auf 93.5 bzw. 167.9 im Rückstand des letzten Eluates an. Aus der Höhe

dieser Rhodan- und Jodzahlen war zu schließen, daß in den Triglyceriden mindestens zwei ungesättigte Fettsäuren vorkommen müssen, von denen wiederum eine mehrfach ungesättigt sein muß. Ferner ließ sich aus der Höhe dieser Zahlen errechnen, daß im Rückstand des ersten Eluates pro Mol Triglycerid 2 Mol Rhodan und 3 Mol Jod, im Rückstand des letzten Eluates 3 Mol Rhodan und 6 Mol Jod pro Mol Triglycerid aufgenommen wurden. Abb. 2 bringt dieses graphisch zum Ausdruck.

Da Triglyceridmoleküle immer nur ganzzahlige Halogenmoleküle anlagern, ist bei einem Anstieg der Rhodanzahl von zwei auf drei pro Triglyceridmolekül anzunehmen, daß bei Chlorella nur zwei Triglyceride vorkommen. Der progressive und nicht sprunghafte Anstieg der Rhodanzahl — und ebenso auch der Jodzahl — ist darauf zurückzuführen, daß bei der Adsorption und bei der Elution keine scharfe Trennung der Triglyceride erfolgt, so daß im Rückstand des ersten Eluates wohl das erste Triglycerid enthalten ist, während die folgenden in zunehmendem Maße mit dem zweiten Triglycerid vermengt sind und erst im letzten Eluat das zweite Triglycerid allein enthalten ist.

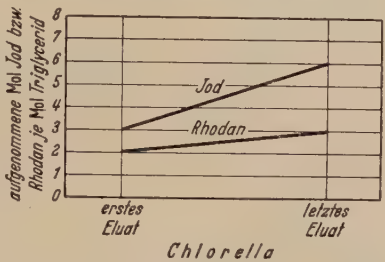
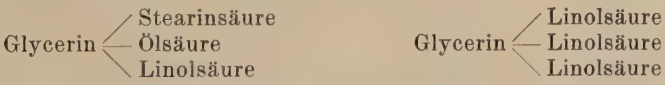


Abb. 2. Jod- und Rhodanaufnahme beim Triglycerid von Chlorella.

Da die Hauptmenge der Triglyceride im Chlorellafett Fettsäuren mit der durchschnittlichen C-Atom-Zahl 18 besitzt und die ungesättigten Fettsäuren in natürlichen Fetten meist vom Typ der Ölsäure, Linolsäure und Linolensäure sind, ist es sehr wahrscheinlich, daß diese auch in den Chlorellalipoiden vorkommen. Leider war es wegen der geringen Extraktmengen nicht möglich, die Fettsäuren näher zu analysieren. Die Annahme, daß es sich bei den Fettsäuren hauptsächlich um Ölsäure und Linolsäure handelt, wird durch die Höhe der Jod- bzw. Rhodanzahlen höchstwahrscheinlich gemacht. Im Chlorellalipoid kann man daher zwei Triglyceride folgender Zusammensetzung annehmen:



Jede andere Zusammensetzung würde ein anderes Verhältnis zwischen den Jod- und Rhodanzahlen ergeben.

Die Menge der im Äthereluat neben dem freien Sterin erfaßten Diglyceride, die bei der Adsorption von Triglyceriden an Aluminiumoxyd entstanden sind (siehe Versuch IV B Seite 608/609), ist als Triglycerid in die Bilanz eingesetzt worden. Die Summe der in sämtlichen Eluaten aus der Aluminiumoxydsäule erfaßten Substanzen betrug praktisch 100% der verwandten Substanzmengen, so daß sich daraus ergibt, daß präformierte freie Fettsäuren im Chlorellafett nicht in nachweisbarer Menge enthalten sind.

Tabelle II. Analyseergebnisse, gewonnen an der Lipoidfraktion von *Nitzschia palea*.

1. Adsorptionsversuch		2. Adsorptionsversuch		3. Adsorptionsversuch	
Ausgangsmenge: 1.00 g Trockensubstanz ergaben 194.1 mg (= 19.4 %) ätherlöst. Lipoid		Ausgangsmenge: 1.65 g Trockensubstanz ergaben 283.3 mg (= 17.2 %) ätherlöst. Lipoid		Ausgangsmenge: 1.25 g Trockensubstanz ergaben 219.0 mg (= 17.5 %) ätherlöst. Lipoid	
194.1 mg = 100 %		Säule aus 300 g Saccharose. 283.3 mg = 100 %		219.0 mg = 100 %	
gelöst in je 100 ccm Petroläther/Benzol 14 : 1.		gelöst in je 100 ccm Petroläther/Benzol 14 : 1. nachgewaschen mit Petroläther/Benzol 14 : 1			
Filtrate: 1. 126.4 mg		215.5 mg		183.9 mg	
2. 27.6 mg		5.9 mg		5.4 mg	
3. 8.0 mg		3.9 mg		2.0 mg	
4. 4.5 mg		4.2 mg		0.6 mg	
5. 0.5 mg		0.2 mg		0.0 mg	
167.0 mg = 86.0 %		229.7 mg = 81.1 %		191.9 mg = 87.6 %	
0.8 mg = 0.4 %		1.1 mg = 0.4 %		1.3 mg = 0.6 %	
28.3 mg = 14.6 %		57.8 mg = 20.4 %		28.3 mg = 12.9 %	
196.1 mg = 101.0 %		288.6 mg = 101.9 %		221.5 mg = 101.1 %	
Phosphatide: Farbstoffe:		Säule aus 100 g Aluminiumoxyd, gelöst in je 100 ccm Petroläther, nachgewaschen mit Petroläther			
in % der zum Adsorptionsversuch verwandten 194.1 mg		in % der zum Adsorptionsversuch verwandten 283.3 mg		in % der zum Adsorptionsversuch verwandten 219.0 mg	
Filtr.: 1. 0.2 mg		1.3 mg		2.5 mg	
2. 0.1 mg		1.0 mg		2.6 mg	
3. 0.4 mg		0.8 mg		1.1 mg	
0.7 mg = 0.4 %		3.1 mg = 1.1 %		6.2 mg = 2.8 %	

eluiert mit Tetrachlorkohlenstoff

Eluate: 1. 2. 3.	1.5 mg	0.9 mg	= 1.3%	1.7 mg	2.1%
	0.7 mg	1.5 mg		1.3 mg	
	0.3 mg	1.3 mg		1.6 mg	
	2.5 mg	3.7 mg		4.6 mg	
eluiert mit Benzol					
Eluate: 1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11.	7.1 mg	3.8 mg	= 62.7%	4.4 mg	VZ.*) 193.8
	23.8 mg	12.4 mg		19.5 mg	
	45.2 mg	36.8 mg		22.7 mg	
	42.7 mg	34.6 mg		27.8 mg	
	6.2 mg	22.8 mg		28.7 mg	
	3.1 mg	23.4 mg		16.4 mg	
	2.0 mg	19.1 mg		18.5 mg	
	0.0 mg	9.2 mg		8.1 mg	
	0.0 mg	9.0 mg		8.4 mg	
	0.0 mg	6.6 mg		9.7 mg	
	0.0 mg	0.0 mg		0.7 mg	
				164.9 mg	= 75.3%

eluiert mit Äther

Eluate:	1. 9.2 mg	= 0.9 mg St.**)	= 1.1%	1.4 mg	= 0.0 mg St.**)	= 1.5%	10.6 mg	= 4.4 mg St.**)	= 2.0%
	2. 15.5 mg	= 1.2 mg St.		27.5 mg	= 4.1 mg St.		2.5 mg	= 0.0 mg St.	
	3. 2.3 mg	—		1.5 mg	—		0.0 mg	—	
	4. 0.0 mg	—		0.0 mg	—		0.0 mg	—	
	27.0 mg	Sterin		30.4 mg	Sterin		13.1 mg	Sterin	
	— 2.1 mg			— 4.1 mg			— 4.4 mg		
	24.9 mg	= Diglyceride		26.3 mg	= Diglyceride		8.7 mg	= Diglyceride	
	Diglyceride berechnet als			Diglyceride berechnet als			Diglyceride berechnet als		
	Triglyceride: = 17.9%			Triglyceride: = 13.0%			Triglyceride: = 5.6%		
Gesamteluat:									

*) RhZ. = Rhodanzahl, JZ. = Jodzahl, VZ. = Verseifungszahl **) St. = Sterin.

Tabelle III. Analysenergebnisse, gewonnen an der Lipoidfraktion von *Scenedesmus*.

1. Adsorptionsversuch		2. Adsorptionsversuch		3. Adsorptionsversuch	
Ausgangsmenge: 1.75 g Trockensubstanz ergaben 174.8 mg (= 10.0%) ätherlöstl. Lipoid		Ausgangsmenge: 1.75 g Trockensubstanz ergaben 168.2 mg (= 9.6%) ätherlöstl. Lipoid		Ausgangsmenge: 2.70 g Trockensubstanz ergaben 336.9 mg (= 12.5%) ätherlöstl. Lipoid	
174.8 mg = 100%		Säule aus 300 g Saccharose 168.2 mg = 100%		336.9 mg = 100%	
gelöst in je 100 cem Petroläther/Benzol 14:1.		nachgewaschen mit Petroläther/Benzol 14:1			
Filtrate: 1. 98.9 mg		101.3 mg		176.9 mg	
2. 1.6 mg		0.8 mg		18.4 mg	
3. 0.2 mg		0.5 mg		1.6 mg	
4. 0.3 mg		0.5 mg		1.2 mg	
5. 0.0 mg		0.0 mg		0.1 mg	
101.0 mg = 57.8%		103.1 mg = 61.5%		198.2 mg = 58.8%	
0.3 mg = 0.2%		1.7 mg = 1.0%		2.5 mg = 0.8%	
74.3 mg = 42.5%		60.4 mg = 35.9%		129.3 mg = 38.4%	
175.6 mg = 100.5%		165.2 mg = 98.4%		330.0 mg = 98.0%	
Phosphatide:		Säule aus 100 g Aluminiumoxyd,			
Farbstoffe:		gelöst in je 100 cem Petroläther, nachgewaschen mit Petroläther			
		in % der zum Adsorptionsversuch verwandten		in % der zum Adsorptionsversuch verwandten	
Filtr.: 1. 6.9 mg		6.0 mg		11.1 mg VZ.*) 89.7	
2. 0.0 mg		0.4 mg		1.2 mg	
3. 0.0 mg		0.0 mg		0.4 mg	
4. 0.0 mg		0.0 mg		0.5 mg	
6.9 mg = 3.9%		6.4 mg = 3.8%		13.2 mg = 3.9%	

Eluate:		= 0.3%		= 0.5%		= 0.1%	
1.	0.1 mg	0.4 mg		0.4 mg		0.4 mg	
2.	0.5 mg	0.4 mg		0.1 mg		0.1 mg	
	0.6 mg	0.8 mg				0.5 mg	
eluert mit Benzol							
1.	3.8 mg	7.9 mg		6.8 mg			
2.	10.7 mg	30.6 mg		50.1 mg		189.5	
3.	31.0 mg	18.6 mg		41.0 mg		184.5	
4.	26.4 mg	14.7 mg		38.7 mg		193.1	
5.	3.3 mg	3.6 mg		3.4 mg		—	
6.	3.0 mg	3.0 mg		3.5 mg		—	
7.	0.0 mg	0.3 mg		1.9 mg		—	
8.	0.0 mg	0.0 mg		0.0 mg		—	
	78.2 mg	78.7 mg		145.4 mg		—	
		= 44.7%		= 46.8%		= 43.2%	
eluert mit Äther							
1.	2.3 mg	2.4 mg		9.4 mg		1.3 mg St.**)	
2.	2.0 mg	2.6 mg		11.0 mg		6.2 mg St.	
3.	1.6 mg	2.0 mg		5.0 mg		4.1 mg St.	
4.	1.5 mg	2.2 mg		2.3 mg		0.3 mg St.	
5.	3.5 mg	1.5 mg		0.6 mg		0.0 mg St.	
6.	2.0 mg	0.9 mg		0.8 mg		0.0 mg St.	
7.	0.0 mg	0.0 mg		0.0 mg		—	
	12.9 mg	11.6 mg		29.1 mg		—	
	6.7 mg	5.7 mg		11.9 mg		Sterin	
	6.2 mg	5.9 mg		17.2 mg		Diglyceride	
Diglyceride berechnet als		Diglyceride berechnet als		Diglyceride berechnet als		Diglyceride berechnet als	
Triglyceride: = 5.0%		Triglyceride: = 4.9%		Triglyceride: = 7.1%		Triglyceride: = 57.8%	
Gesamteluat:		= 57.7%		= 59.4%		= 57.8%	

*) RhZ. = Rhodanzahl, JZ. = Jodzahl, VZ. = Verseifungszahl. **) St. = Sterin.

Wie schon im Anfang der Arbeit (Seite 604) gesagt wurde, lassen sich die ätherischen Öle zunächst nicht durch die Adsorptionmethode erfassen. Um ihre Menge festzustellen, wurden in besonderen Versuchen die Chlorellalipoide der Wasserdampfdestillation unterworfen. Da die Destillate verhältnismäßig wenig ätherisches Öl erhielten, extrahierte ich es aus dem Destillat mit Äther. Der Äther wurde verdampft, der Rückstand im Vakuumexsikkator kurz evakuiert und anschließend gewogen. In einem solchen als Beispiel hier mitgeteilten Versuch erhielt ich von 409.1 mg Ausgangsmaterial 6.2 mg = 1.5% ätherisches Öl. Das Öl besaß einen mehr oder minder scharfen, etwas senföartigen Geruch und zeichnete sich durch sehr hohe Viskosität aus. Wegen der geringen Menge war es nicht möglich, eine nähere Analyse durchzuführen. Mit fuchsin-schwefeliger Säure ließen sich keine Aldehyde, mit Eisen III-Chlorid keine Phenole und mit Lackmus keine Carbonsäuren nachweisen.

Die voranstehenden Tabellen II und III zeigen, daß die *Nitzschia*- und *Scenedesmus*-Lipoide ähnlich zusammengesetzt sind wie die *Chlorella*-Lipoide.

Der Gehalt der an der Saccharosesäule adsorbierten Phosphatide betrug auch bei diesen beiden Algen weniger als 1%, der Gehalt an Farbstoffen war bei *Nitzschia* etwa gleich groß, bei *Scenedesmus* etwa dreimal so groß wie bei *Chlorella*. Von grünen Farbstoffen erhielt *Scenedesmus* Chlorophyll a und b und die Phaeophytine a und b, während bei *Nitzschia* nur Chlorophyll a und Phaeophytin a nachweisbar waren. Bei der Diatomee wurde auf der Saccharosesäule neben dem Xanthophyll noch ein gelber, wahrscheinlich sauerstoffhaltiger Farbstoff erkennbar, der von der Saccharose stärker als Xanthophyll und schwächer als Chlorophyll a adsorbiert wurde. Da dieser unbekannte Farbstoff im Entmischungsversuch in 90%iges Methanol, aber nicht in 70%iges Methanol überging, ist er nicht mit Fucoxanthin identisch.

Die Fraktion der Kohlenwasserstoffe und Wachse ist bei *Nitzschia* kaum größer als bei *Chlorella*, dagegen bei *Scenedesmus* mit 3.9% deutlich erhöht und auch fast ausschließlich im Filtrat enthalten. Bei der im 3. *Scenedesmus*-Adsorptionsversuch zur Verfügung stehenden größeren Menge von 11.1 mg wurde die Verseifungszahl bestimmt und mit 89.7 ermittelt. Dies beweist, daß die Substanz kein Kohlenwasserstoff ist. Der Größenordnung nach könnte es ein Sterinester sein, aber nach dem Verhalten im Adsorptionsversuch muß es ein Wachs sein. Zur Bestätigung seiner Wachsnatur wurden die im 2. *Scenedesmus*-Adsorptionsversuch gewonnenen 6.0 mg Substanz mit Natriumäthylat verseift und nach Verdünnen mit Wasser die Äthylalösung mit Petroläther extrahiert. Der nach Verdampfen des Petroläthers erhaltene Rückstand war fest. Da er in wenig Alkohol gelöst auf Zusatz alkoholischer Digitoninlösung keinen Niederschlag gab, kann es sich nicht um einen Sterinester handeln, sondern um ein

Wachs. Wegen der geringen Menge des zur Verfügung stehenden Wachses ist die Verseifungszahl sicherlich mit einem verhältnismäßig großen Fehler belastet, so daß sich vorerst über die Komponenten des Wachses keine Aussagen machen lassen.

Sterinester waren bei *Scenedesmus* kaum vorhanden; bei *Nitzschia* betrug ihre Menge im Mittel der drei Adsorptionsversuche 1.6%. Es ist aber auch hier wie bei *Chlorella* (siehe Seite 619) fraglich ob es sich ausschließlich um Sterinester handelt.

Die Menge der freien Sterine war bei *Nitzschia* mit 1.5% im Mittel höher als bei *Chlorella* (0.3%) und bei *Scenedesmus* mit 3.6% am höchsten.

In der Triglyceridfraktion zeigten wie bei *Chlorella* die Rückstände aller aufeinanderfolgenden Eluate sowohl bei *Nitzschia* wie bei *Scenedesmus* die gleichen Verseifungszahlen, auch stimmte die Größe der Verseifungszahlen mit den bei *Chlorella* ermittelten überein, so daß auch die Triglyceride von *Nitzschia* und *Scenedesmus* Fettsäuren mit der durchschnittlichen C-Atomzahl 18 enthalten dürften. Auch waren die Rhodanzahlen bei *Nitzschia* und *Scenedesmus* stets

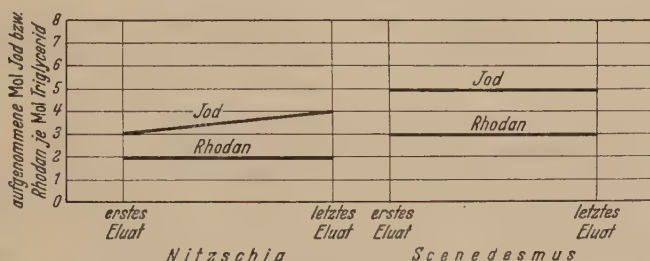
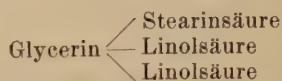
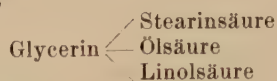


Abb. 3. Jod- und Rhodanaufnahme bei den Triglyceriden von *Nitzschia* und *Scenedesmus*.

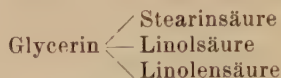
niedriger als die Jodzahlen. Aber die Rhodanzahlen blieben bei diesen beiden Algenlipoiden im Gegensatz zum Verhalten der *Chlorella*-triglyceride in allen aufeinanderfolgenden Eluatrückständen gleich, bei *Scenedesmus* blieben auch die Jodzahlen in den aufeinanderfolgenden Eluatrückständen unverändert, und nur bei *Nitzschia* stiegen die Jodzahlen wie bei *Chlorella* kontinuierlich an. Auch hier ließ sich aus der Höhe der Jod- und Rhodanzahlen die auf ein Triglyceridmolekül entfallende Jod- und Rhodanmenge errechnen. Sie betrug bei *Nitzschia* im ersten eluierten Triglycerid 3 Mol Jod und 2 Mol Rhodan, im letzten eluierten Triglycerid 4 Mol Jod und 2 Mol Rhodan. Von den *Scenedesmus*-Triglyceriden wurden pro Mol stets nur 5 Mol Jod und 3 Mol Rhodan aufgenommen. Graphisch ist dieses Verhalten in Abb. 3 wiedergegeben.

Unter Zugrundelegung der auf Seite 623 gemachten Ausführungen und der ermittelten Kennzahlen ist anzunehmen, daß in den Lipoiden

von *Nitzschia* zwei Triglyceride, und zwar von folgender Zusammensetzung



vorkommen, in den Lipoiden von *Scenedesmus* nur eines von der Zusammensetzung



Diglyceride waren auch bei *Nitzschia* und *Scenedesmus* wie bei *Chlorella* im Ätherluat enthalten. Anhaltspunkte für die Anwesenheit präformierter freier Fettsäuren ergaben sich auch hier nicht.

An ätherischen Ölen wurden bei *Nitzschia* aus 93.4 mg Substanz durch Wasserdampfdestillation 8.9 mg = 9.5 % abgetrennt, bei *Scenedesmus* aus 221.8 mg Substanz 4.5 mg = 2.0 %. Beide Öle waren sehr viskos und rochen senfölig. Die gleichen Reaktionen, die bei dem ätherischen Öl aus *Chlorella* negativ verlaufen waren (siehe Seite 628), waren auch hier negativ.

Zur besseren Übersicht sind die Analysenergebnisse der an den Algenlipoiden durchgeführten Versuche in Tabelle IV anschaulich dargestellt:

Tabelle IV. Prozentuale Zusammensetzung der Lipoiden.

Gesamtlipoiden in % der Trockensubstanz	<i>Chlorella</i> 27.6	<i>Nitzschia</i> 18.0	<i>Scenedesmus</i> 10.7
darin Farbstoffe	14.3%	16.0%	38.9%
Phosphatide	0.9%	0.5%	0.7%
Kohlenwasserstoffe und Wachse	0.5%	1.4%	3.9%
Sterinester?	2.4%	1.6%	0.3%
Freie Sterine	0.3%	1.5%	3.6%
Triglyceride	78.5%	80.5%	50.6%
Freie Fettsäuren	—	—	—
	96.9%	101.5%	98.0%

Wie man aus dieser Darstellung besonders deutlich sieht, ist die Zusammensetzung der ätherlöslichen Lipoidfraktion bei *Chlorella* und *Nitzschia* sehr ähnlich, bei *Scenedesmus* ist die Triglyceridfraktion prozentual geringer und dafür die Farbstoff-Fraktion — und auch die übrigen Fraktionen — prozentual erhöht. Der Gehalt der ätherlöslichen Lipoidfraktion an ätherischem Öl war bei *Nitzschia* mit 9.5 % erheblich höher als bei den Grünalgen, was vielleicht für die Verwertbarkeit dieser Algenfette für die menschliche Ernährung von Bedeutung sein könnte.

Vergleicht man die Zusammensetzung der von mir untersuchten Lipoidfraktionen autotropher Mikroorganismen mit der von Lipoiden heterotropher Mikroorganismen und höherer Pflanzen, z. B. Samen-fetten, so findet man keine grundsätzlichen Unterschiede. In den Fetten niederer wie höherer Pflanzen kommen Triglyceride vor mit einem sehr hohen Prozentsatz ungesättigter, vor allem auch mehrfach ungesättigter Fettsäuren. Zum Vergleich seien in Tabelle V einige Kennzahlen und die prozentuale Beteiligung einiger Lipoidbestandteile bei dem Chlorellaöl, dem Öl der Nektarhefe und dem Mohnöl nebeneinandergestellt:

Tabelle V. *Zusammensetzung einiger Lipoide.*

	Chlorellaöl	Öl der Nektarhefe (RIPPEL-BALDES, 1947)	Mohnöl (BÖHMER)
Verseifungszahl	Mittel 190	197	189—194
Jodzahl	93—168	70	131—143
Rhodanzahl	64— 94	—	76— 79
Phosphatide	weniger als 1%	—	Spur
Freie Sterine	0.3%	—	0.2%
Sterinester	0.3%	—	0.02%
Unverseifbares	wenig. als 0.8% ^{*)}	0.21%	0.4—0.6%

^{*)} ohne Farbstoffe.

Bei dem Öl der heterotrophen Nektarhefe sind erst wenige Daten bekannt, so daß ein befriedigender Vergleich dieses Öles mit den beiden anderen Ölen noch nicht möglich ist. Insgesamt aber zeigt sich, daß die autotrophen und wahrscheinlich auch die heterotrophen Mikroorganismen die gleichen bzw. ähnlich zusammengesetzte Lipoide zu bilden vermögen wie höhere Pflanzen, daß meist nur in quantitativer Hinsicht individuelle Unterschiede bestehen. Nur eine Ausnahme ist mir nach Abschluß dieser Arbeit dank einer persönlichen Mitteilung von Herrn Dr. G. E. FOGG vom Department of Botany vom University College London bekannt geworden: H. T. CLARKE und A. MAZUR berichten im Journal of Biological Chemistry **141**, 283—289 (1941), daß sie in frisch gesammelten marinen *Diatomeen* einen hohen Gehalt an freien Fettsäuren (80 %) neben 17 % Estern fanden. Ob dieser ungewöhnlich hohe Gehalt an freien Fettsäuren sich auch in anderen marinen Mikroorganismen findet oder ob die Art der Aufarbeitung eine andere war, vermag ich im Augenblick nicht zu klären.

Eine weitere Analyse bzw. genauere Identifizierung der einzelnen Bestandteile der Lipoide autotropher Mikroorganismen ist sicherlich möglich, sobald größere Mengen von Ausgangsmaterial zur Verfügung stehen. Dabei würde sich auch der prozentuale Fehler bei der Wägung der einzelnen Rückstände verkleinern. Immerhin zeigen bereits die in dieser Arbeit mitgeteilten Versuche, daß mittels der Adsorptionsmethode

die Analyse eines Lipoidgemisches auch an wenig Ausgangsmaterial möglich ist.

Nachtrag bei der Korrektur.

Aus der Carnegie Institution of Washington, Division of Plant Biology, Stanford, California, sind inzwischen Arbeiten erschienen, die sich gleichfalls mit der Zusammensetzung des in *Chlorella* Kulturen (*Chlorella pyrenoidosa*) gebildeten Fettes beschäftigen [H. A. SPOEHR: Carnegie Institution of Washington Year Book No. 46, 94 (1947); H. W. MILNER: Journ. of Biol. Chem. 176, 813 (1948); H. A. SPOEHR u. H. W. MILNER: Plant Physiology 24, 120 (1949); H. A. SPOEHR, J. H. C. SMITH, H. H. STRAIN, H. W. MILNER u. G. J. HARDIN: Fatty acid antibacterials from plants, Carnegie Institution of Washington Publication 586 (1949)]. Um die Gesamtlipoidgehalte möglichst vollständig zu erfassen, wurden die getrockneten Algen (27.15 % Trockensubstanzgehalt), nach Vorbehandlung mit Wasser, mehrmals nacheinander abwechselnd mit Methylalkohol und Petroläther, zum Schluß mit Äther extrahiert. Nach Entfernung der organischen Lösungsmittel im Vakuum aus den vereinigten Extrakten wurde der Rückstand mit Äther extrahiert und der nach Entfernung des Äthers verbleibende Rückstand im Vakuum zur Konstanz getrocknet. Dieser Gesamtlipoidgehalt konnte durch Variation der äußeren Bedingungen bei der Kultur der Algen von 23 % bis auf 76 % der getrockneten Algen gebracht werden. Davon waren 77 bis 69 % Neutralfett, der Rest Unverseifbares. Bei geringem Gesamtlipoidgehalt der Algen war der Anteil an Unverseifbarem und an wasserlöslichen Verseifungsprodukten wesentlich größer als bei hohem Gesamtlipoidgehalt, der Chlorophyllgehalt z. B. sank von 6 % auf 0.03 %.

Eine Fraktionierung der Lipide in der von mir durchgeführten Art erfolgte nicht, vielmehr wurden die Gesamtlipide (aus 50—1000 g getrockneter Algen) verseift und die Fettsäuren über die Bleisalze und Methylester in üblicher Weise getrennt. 54—70 % der gesamten Fettsäuren gehörten zu den C_{18} Fettsäuren, der Rest zu den C_{16} Fettsäuren, und die ungesättigten Fettsäuren übertrafen an Menge mit 83—88 % der gesamten Fettsäuren die gesättigten bei weitem. Die Jodzahlen schwankten in den einzelnen Ansätzen zwischen 125 und 163, ließen auf die Anwesenheit von dreifach ungesättigten Fettsäuren schließen und waren bei geringem Gesamtlipoidgehalt der Algen am höchsten. Das durchschnittliche Molekulargewicht blieb mit Schwankungen zwischen 269 und 274 in allen Ansätzen fast konstant.

Diese Ergebnisse stimmen im wesentlichen mit meinen Ergebnissen überein. Daß sich in meinen Versuchen keine Anhaltspunkte für die Anwesenheit von C_{16} Fettsäuren ergaben, kann darauf beruhen, daß ihre Menge zu gering war, als daß sie bei meinem indirekten Verfahren erfaßt wurden, kann aber auch auf dem andersartigen Kulturverfahren der Algen oder einer anderen als der von mir verwandten *Chlorella*-Art oder auf dem andersartigen Extraktionsverfahren beruhen.

Zusammenfassung.

Die vorliegende Arbeit hat im wesentlichen folgendes ergeben:

1. Auf Grund von Modellversuchen an verschiedenen Lipiden ist eine Methode nach dem Prinzip des Adsorptionsverfahrens entwickelt worden, mit deren Hilfe geringe Mengen (1 g und weniger) eines

Lipoidgemisches in relativ kurzer Zeit analysiert werden können. Die Brauchbarkeit der Methode ist an einem künstlich zusammengestellten Lipoidgemisch gezeigt worden.

2. Mit dieser Methode wurden Lipoidgemische aus zwei Grünalgen (*Chlorella* und *Scenedesmus*) und einer Diatomee (*Nitzschia palea*), alle drei aus künstlicher Kultur, analysiert.

3. Die drei Algenfette bestanden zu 50–80 % aus Triglyceriden, zu 14–39 % aus Pflanzenfarbstoffen (Chlorophylle und Carotinoide), zu 3–4 % aus freien und gebundenen Sterinen, zu 0.5–0.9 % aus ätherlöslichen Phosphatiden und zu 0.5–4 % aus Kohlenwasserstoffen bzw. Wachsen. Präformierte freie Fettsäuren waren nicht nachweisbar. Die Menge der durch Wasserdampfdestillation abgetrennten ätherischen Öle betrug 1.5–9.5 %.

4. Die Triglyceridfraktion wurde durch die Bestimmung der Verseifungs-, Jod- und Rhodanzahlen näher analysiert und aus diesen Zahlen auf die Konstitution der am Triglyceridaufbau beteiligten Fettsäuren geschlossen.

5. Die Zusammensetzung der Algenlipoide ist ähnlich der der Fette in heterotrophen Mikroorganismen und in Samen höherer Pflanzen, wie aus einer Gegenüberstellung (Seite 631) ersichtlich wird.

Herrn Professor Dr. R. HARDER, der die Anregung zu dieser Arbeit gab, und Herrn Professor Dr. H. J. DEUTICKE, unter dessen Leitung sie ausgeführt wurde, danke ich herzlich für ihre Unterstützung.

Literatur.

BARG, T.: Ber. Deutsch. botan. Ges. **61**, 13 (1942). — BERNHAUER, K. und Mitarbeiter: Biochem. Z. **319**, 77, 94, 102 (1948). — BOKORNY, Th.: Biochem. Z. **75**, 346 (1916). — BÖHMER, A., A. JUCKENACK u. J. TILMANS: Handbuch der Lebensmittelchemie. Bd. IV. Berlin 1939.

DAMM, H.: Chem. Zeitg., **67**, 47 (1943). — DIEMAIR, W., B. BLEYER u. W. SCHMIDT: Biochem. Z. **294**, 353 (1937). — DIRR, K. u. O. v. SODEN: Biochem. Z. **312**, 263 (1942).

FINK, H. u. F. JUST: Biochem. Z. **300**, 84 (1939).

GATTERMANN, L. u. H. WIELAND: Die Praxis des organ. Chemikers **31**. Auflage, 399 (1944). — GROSSFELD, I.: Z. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genussmittel- bzw. Lebensmittel **62**, 447 (1931).

HARDER, R. u. H. v. WITSCH: Ber. Deutsch. botan. Ges. **60**, 146 (1942); Der Forschungsdienst, Sonderheft **16**, 270 (1942). — HÜTTEL, R. u. H. BEHRINGER: Z. physiol. Chem. **245**, 175 (1937).

KARRER, P. u. H. SALOMON: Helv. chim. Acta **20**, 424 (1937). — KAUFMANN, H. P.: Studien auf dem Fettgebiet. Berlin (1935). — KAUFMANN, H. P.: Angew. Chem. **53**, 98 (1940). — KUHN, R., A. WINTERSTEIN u. E. LEDERER: Z. physiol. Chem. **197**, 141 (1931). — KUHN, R. u. E. LEDERER: ebenda **200**, 108 (1931). — KUHN, R. u. H. BROCKMANN: ebenda **206**, 41 u. **213**, 192 (1932).

LINDNER, P.: Angew. Chem. **35**, 110 (1922). — LOHMANN, K. u. L. JENDRASSIK: Biochem. Z. **178**, 419 (1927).

MÜHLBOCK, O. u. C. KAUFMANN: Biochem. Z. **233**, 222 (1931).

NILSSON, R., L. ENEBO, H. LUNDIN u. K. MYRBÄCK: Svensk Kemisk Tidskrift **55**, 41 (1943).

REWALD, B.: Biochem. Z. **202**, 399 (1928). — RIECHE, A.: Angew. Chem. **44**, 896 (1931). — RIPPEL-BALDES, A.: Grundriß der Mikrobiologie. Berlin und Göttingen, S. 70, (1947). — RIPPEL-BALDES, K. PIETSCHMANN-MEYER u. W. KÖHLER: Arch. f. Mikrobiol. **14**, 113 (1948).

SCHWARZ, W.: Angew. Chem. **50**, 294 (1937).

THALER, H.: Z. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußmittel bezw. Lebensmittel, **75**, 130 (1938). — TRAPPE, W.: a) Biochem. Z. **305**, 150 (1940). — TRAPPE, W.: b) Ebenda **306**, 316 (1940). — TRAPPE, W.: c) Ebenda **307**, 97 (1940/41).

VAGELER, H.: Biochem. Z. **17**, 201, (1909).

WAGNER-JAUREGG, TH.: Z. physiol. Chem. **247**, 135 (1937). — WIELAND, H., H. PASEDACH u. A. BALLAUF: Liebigs Ann. **529**, 68 (1937). — WIELAND, H. u. Y. KANAOKA: ebenda **530**, 146 (1937). — WINDAUS, A. u. O. STANGE: Z. physiol. Chem. **244**, 218 (1936). — WINTERSTEIN, A. u. G. STEIN: a) Z. physiol. Chem. **220**, 247 (1933). — WINTERSTEIN, A. u. G. STEIN: b) ebenda **220**, 263 (1933).

(Aus den Botanischen Anstalten der Universität Göttingen.)

Entwicklungsgeschichtliche und physiologische Untersuchungen an Laboratoriumskulturen der Rotalge *Trailliella intricata* Batters (*Bonnemaisoniaceae*).*

Von

WULF KOCH.

Mit 25 Textabbildungen.

(Eingegangen am 16. Januar 1949).

Die kleine auf Steinen oder epiphytisch auf anderen Algen lebende Rotalge *Trailliella intricata* ist zuerst 1896 von BATTERS als nov. spec. von Standorten der englischen Südküste beschrieben worden. In den folgenden Jahrzehnten wurden zahlreiche neue Fundorte in Europa (u. a. KYLIN 1916, PETERSEN 1918, CHEMIN 1923, ROSENVINGE 1923/24), Amerika (KYLIN 1925, LEWIS u. TAYLOR 1928), Afrika (BOERGENSEN 1930) und Japan (INAGAKI 1935) bekannt. Trotzdem ist die systematische Stellung der Alge bis heute umstritten (vergl. u. a. ROSENVINGE 1923/24, LEVRING 1937, J. u. G. FELDMANN 1942). Es war deshalb zunächst die Aufgabe der vorliegenden Arbeit, an Laboratoriumskulturen die unbekannten entwicklungsgeschichtlichen Verhältnisse von *Trailliella intricata* zu untersuchen und gleichzeitig mit den gewonnenen Ergebnissen die gegenteiligen Auffassungen von KYLIN (1945) und FELDMANN (1946) über den Generationswechsel einiger *Bonnemaisoniaceen*, zu denen *Trailliella intricata* nach einer „Arbeitshypothese“ von J. u. G. FELDMANN (1942, S. 147) als Tetrasporophyt gehören soll, zu klären. Ferner wird über gewisse physiologische Beobachtungen an den Kulturen berichtet.

I. Experimenteller Teil.

A. Material und Kulturmethode.

Einzelne wenig verzweigte Fäden von *Trailliella intricata* wurden 1944 aus Helgoländer Meeresplankton isoliert und in Kultur genommen. Sie wuchsen (s. a. CHEMIN 1928 a) verhältnismäßig leicht zu neuen Algenbüscheln aus, von denen immer wieder neue Tochterkulturen durch Abtrennen einzelner Fäden isoliert werden konnten.

Nach ausgedehnten Vorversuchen mit verschiedensten Nährlösungen erwies sich schließlich Helgoländer Hochseewasser (Salzgehalt 3,3%) mit Zusatz einer Eisenzitrat-Schreibersalzlösung (55 ccm auf 1000 ccm Seewasser, vergl. KYLIN 1943) als bestes Kulturmedium.

* Teilergebnisse einer Dissertation der Math.-Naturw. Fakultät in Göttingen 1949.

Das ständig im Keller aufbewahrte Seewasser wurde vor Gebrauch filtriert (Faltenfilter Nr. 588, Schleicher u. Schüll) und im Dampftopf sterilisiert. Die Schreibersalzlösung (0,1 g NaNO_3 und 0,02 g Na_2HPO_4 auf 50 ccm aqua dest.) und die 0,1%ige Eisenzitratlösung wurden für sich hergestellt, sterilisiert und getrennt aufgehoben: erst unmittelbar vor dem Gebrauch wurden die drei Lösungen gemischt (auf 1000 ccm Seewasser 50 ccm Schreibersalzlösung und 5 ccm Eisenzitratlösung). Dabei empfiehlt es sich, die EisenzitratstammLösung häufig zu erneuern, da sie leicht hydrolysiert (vgl. SUNESON 1942, S. 5) und damit unwirksam wird.

Als Kulturgefäße dienten zumeist Petri- und Esmarschalen sowie wie Standzylinder verschiedener Größe aus gewöhnlichem Glas. Zum Übertragen des Algenmaterials von einer Kultur in die andere wurden feine Glasnadeln oder auch dünn ausgezogene Glaspipetten und zum Abtrennen einzelner Fäden des Algenbüschels scharfkantige Glasstäbchen verwendet. Kulturgefäße und Glasinstrumente wurden vor jeder Benutzung in destilliertem Wasser ausgekocht und anschließend sterilisiert.

Der Arbeitsraum lag mit seinen Fensterseiten nach Nordosten und Nordwesten. Die Kulturen standen dort bei Zimmertemperatur bis zu 1 m von den Fenstern entfernt. Das während der Sommermonate morgens und abends einfallende Sonnenlicht wurde durch Pergament-schirme abgeblendet.

Die Temperatur- (Max.-Min. Thermometer) und Lichtverhältnisse (Selenphotozelle S 60 von Dr. B. Lange, Berlin, mit angeschlossenen Ampèremeter) wurden täglich kontrolliert.

Die Untersuchungen unter konstanten Lichtverhältnissen wurden in einem Dunkelzimmer bei künstlichem Licht in einer Kühlapparatur ausgeführt.

Hierzu wurde ein durch fließendes Wasser auf annähernd $16,0^\circ \text{C}$ gehaltenes Metallkasten benutzt, dessen Deckel aus einer Kühlwanne mit Glasboden (fließendes Leitungswasser!) bestand, über der eine Glühlampe aufgehängt war. Die Kulturgefäße mit den Algen standen innerhalb des nach allen Seiten lichtdicht abgeschlossenen Kastens auf Glasplatten in gestaffelter Entfernung von der Lichtquelle (Apparatur A).

Für Kulturversuche innerhalb verschiedener Temperaturbereiche wurden Zinkblechkästen (TI–IV in Abb. 1) benutzt, die um eine zentrale Lichtquelle [Glühlampe in einem Glaszylinder (K) mit fließendem Leitungswasser] standen (Apparatur B).

Die zur Lichtquelle gerichtete Seite der Kästen war durchbrochen und mit einer Glasplatte verschlossen. Ein Deckel mit eingebautem Thermometer

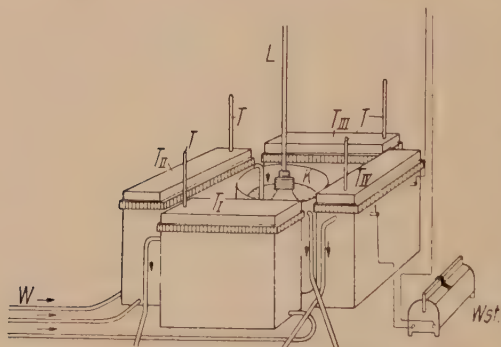


Abb. 1. Apparatur (B) für Wachstumsversuche bei verschiedener Temperatur. TI–IV Temperaturkisten mit Wasserkühlung W, T I–IV Temperaturkisten mit elektrischer Heizung, L Beleuchtung, K Kühlgefäß, W Wasserkühlung, T Thermometer, Wst Widerstand der Heizungsanlage.

meter (T) verschloß jeden Kasten lichtdicht nach oben. Durch alle Kästen lief ein ständiger Wasserstrom (W), dessen Geschwindigkeit reguliert werden konnte und so das Einstellen bestimmter Temperaturen, deren Genauigkeit zwischen $\pm 1,0^{\circ}\text{C}$ schwankte, innerhalb der einzelnen Kästen ermöglichte. Für die Temperaturen über Raumtemperatur wurde ein Kasten (T IV) von der Wasserkühlung abgeschaltet, mit destilliertem Wasser gefüllt und mittels einer sog. „Aquariumsheizung“ (Kochsalzlösung als Flüssigkeitswiderstand) erwärmt.

Die Versuchsalgen kamen innerhalb dieser Kästen in 18 cm hohe und 4 cm weite, zylindrische Glasgefäße, von denen je 4 in jedem Kasten standen. Dabei

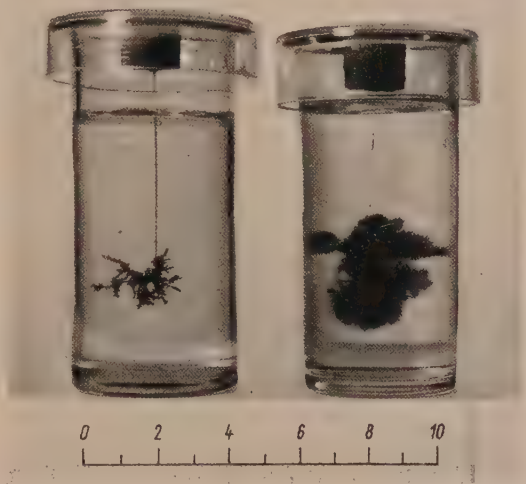


Abb. 2. „Hängekultur“ von *Bonnemaïsonia hamifera* (links) und *Trailliella intricata* (rechts) Phot. 10. 7. 1948. Maßstab in cm.

hingen die größeren Objekte an einem Glashaken oder Seidenfaden von oben in die Nährlösung hinein. Wenigzellige Thallusfäden wurden dagegen zunächst auf einem Objektträger befestigt und dieser dann senkrecht in die Lösung gehängt. Dazu wurden die Algenfäden in einem Tropfen Nährlösung auf den Objektträger gebracht und unter dem Binoocular an einem Seidenfaden von 20μ Durchmesser in folgender Weise aufgehängt: der mit einer offenen Schlaufe versehene Faden wurde auf den Objektträger gelegt, so daß beide Enden überhingen, das Objekt mit einer Glasnadel durch die Schlaufe geschoben, diese dann von den Fadenenden aus zugezogen, und der Faden selbst mit zwei kleinen Paraffintropfen am oberen und unteren Ende des Objektträgers befestigt. Nach Abschneiden der restlichen Fadenenden kam der Objektträger dann in ein Kulturgefäß und zwar so, daß seine Fläche mit der Alge zum Licht gewendet war. Dieses Aufhängen der Algen in der Nährlösung (sog. „Hängekulturen“, vergl. Abb. 2) erwies sich auch bei Tageslichtkulturen am geeignetsten.

B. Der Tetrasporophyt *Trailliella intricata* Batters.

1. Anatomie.

Die in der Nährlösung kultivierten *Trailliella*fäden wuchsen unter optimalen Licht- und Temperaturbedingungen in einigen Monaten zu

zentimetergroßen Algenbüscheln heran (Abb. 2 rechts). Dabei erreichte die Stammkultur (in einer Glasschale von 15 cm Durchmesser und 7 cm Höhe mit ca. 400 ccm Nährlösung) nach eineinhalb Jahren einen Durchmesser von über 10 cm (Abb. 3), obwohl mehrfach Material zur Anzucht neuer Kulturen aus ihr entnommen wurde.

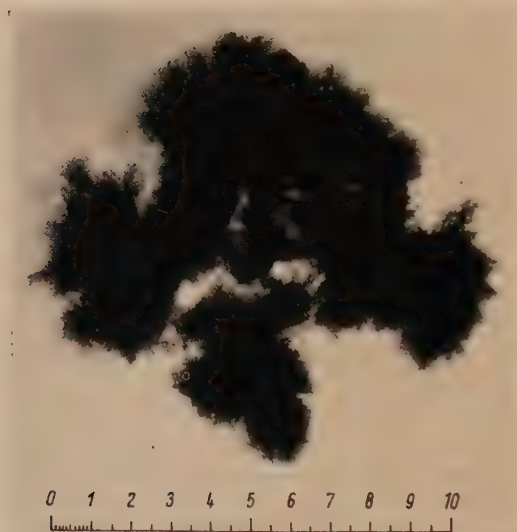


Abb. 3. *Trailliella intricata*. Stammkultur nach 1½ Jahren.
Phot. 10. 7. 1948. Maßstab in cm.



Abb. 4. *Trailliella*-Faden mit Scheitelzelle und Blaszellen ($\times 380$).

Der anatomische Aufbau von *Trailliella intricata* ist zum ersten Mal von BATTERS (1896) ausführlich beschrieben worden. Weitere Einzelheiten haben u. a. KYLIN (1915), ROSENVINGE (1923/24), SCHUSSNIG (1927), BOERGESEN (1930) und TAYLOR (1937) gebracht.

Die eigenen Beobachtungen an dem im Laboratorium kultivierten Algenmaterial stimmen mit den Darstellungen in der Literatur im wesentlichen überein (monosiphone Fäden mit Scheitelzellenwachstum, Ausbildung der charakteristischen Jod- oder Blaszellen, Abb. 4). Während der Untersuchungen zeigte sich jedoch, daß die Zellgröße, die Art der Verzweigung sowie die Ausbildung von Haftorganen weitestgehend von Außenbedingungen abhängig sind. Neben der Abhängigkeit der Anzahl der Verzweigungen von der Lichtintensität (S. 648) bedingten vor allem die Nährlösungen je nach ihrer Zusammensetzung verschiedene Wuchsformen der Algenbüschel. Ein weiterer formativer Einfluß machte sich bei der Bildung der Haftorgane geltend. Diese ent-

stehen (vgl. a. SAUVAGEAU 1925) dadurch, daß die Scheitelzelle irgendeines, zumeist kriechenden Algenfadens sich durch Kontaktreiz mit der Unterlage in ein System kleinzelliger, farbloser Verzweigungen umzuwandeln beginnt (Abb. 5). Zu solcher Kontaktreizreaktion sind, soweit experimentell nachgewiesen werden konnte, sämtliche Scheitelzellen eines *Trailliellabüschels* befähigt. In Verbindung mit der Ausbildung

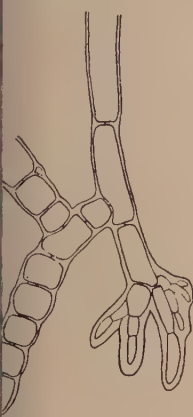


Abb. 5. Haftorgan eines *Trailliellafadens* ($\times 250$).

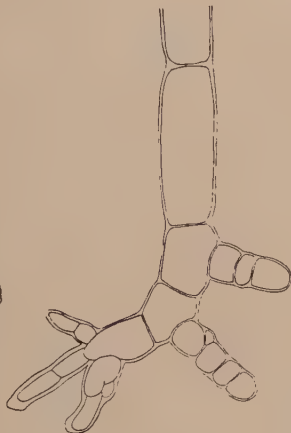


Abb. 6. Beginnende Verzweigung eines *Trailliellafadens* in der Nähe einer durch Kontaktreiz umgewandelten Scheitelzelle ($\times 300$).

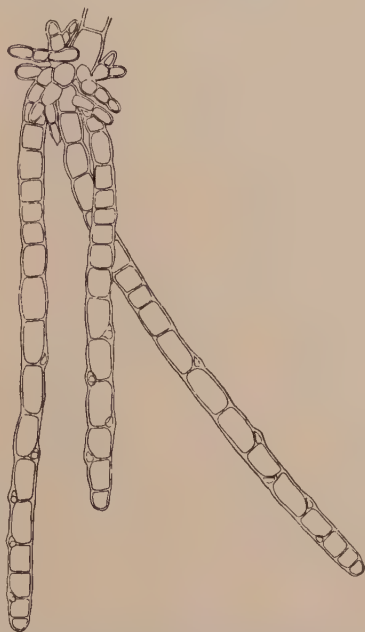


Abb. 7. Auswachsen vom Substrat abgelöster Rhizoidzellen zu neuen *Trailliellafäden* ($\times 150$).

der Haftorgane steht eine gesteigerte Tendenz zur Anlage neuer Verzweigungen in der Nähe der umgewandelten Scheitelzellen (Abb. 6), die naturgemäß bei Kontaktreiz neue Anheftungsstellen und dadurch eine zusätzliche Befestigung des Algenfadens bedingen. Daneben konnte beobachtet werden, daß selbst die Oberfläche der Nährlösung auf die Scheitelzellen aufrecht wachsender *Trailliellafäden* einen Kontaktreiz ausüben konnte. Zwar unterblieb die Anlage eines typischen Haftorgans, jedoch zeigte sich auch hier die vermehrte Ausbildung von Verzweigungen in der Nähe der Berührungsstelle. Da außerdem die bereits am Substrat festgewachsenen Haftorgane nach Ablösung von ihrer Unterlage erneut weiterwachsen können (Abb. 7), war der Habitus der *Trailliellabüschel* in den Kulturen je nach den Außenbedingungen sehr unterschiedlich, und es kamen alle Übergänge vom aufgelockerten, wenig verzweigten Algenbüschel (Abb. 8) bis zum verworrenen

lichten Algenrasen vor (Abb. 9). Eine Feststellung von INAGAKI (1935, S. 43) und Abbildungen von ROSENVINGE (1923/24, S. 306) lassen ver-



Abb. 8. Langfädiges Algenbüschel von *Trailliella* (x 6).

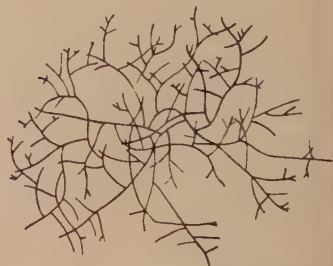


Abb. 9. Stark verzweigter Algenrasen von *Trailliella* (x 6).

muten, daß auch am natürlichen Standort die Gestaltung des Thallus durch Außenfaktoren bestimmt wird.

2. Die Ausbildung der Tetrasporangien.

Ende November 1946 zeigten sich in den „Hängekulturen“, die seit dem Sommer am

Nordostfenster des Arbeitsraumes standen, die typischen Stadien einer Tetrasporangienentwicklung. Diese Beobachtungen waren von besonderem Interesse, denn nach den vorliegenden Literaturangaben sind Tetrasporangien von *Trailliella intricata* nur selten und in den Verbreitungsge-

gebieten von Japan (INAGAKI 1935, SEGAWA 1936) und Nordamerika (KYLIN 1925, TAYLOR

Abb. 10. Tetrasporangienausbildung an einem *Trailliella*-faden. a vor b nach Abgliederung der Tetrasporonmutterzelle (x 320), c reifes Tetrasporangium. Nach fixiertem Material (x 500).

1937) bis heute überhaupt nicht gefunden worden. Nähere Beschreibungen liegen nur von wenigen Standorten in den europäischen Gewässern vor (Abb. bei BATTERS 1900, KYLIN 1922, ROSENVINGE 1923, NEWTON 1931).

Einzelne Zellen der Endfäden des nach allen Seiten hin gewachsenen Algenbüschels schollen zunächst ein wenig an; stellenweise war bereits durch eine Längswand die Abtrennung des späteren Sporangiums von der Fadensegmentzelle erfolgt (Abb. 10 a, b). Das reife Sporangium mit seinen Tetrasporen (Abb. 10 c, 11) war zuletzt stark angeschwollen und dunkelrot gefärbt (Durchmesser 50—70 μ); es öffnete sich in entgegengesetzter Richtung der

sterilen Segmentzelle mittels eines schmalen Spaltes in der Membran, durch welchen die Tetrasporen entleert wurden (Abb. 12 a, b). Die Anlage der Tetrasporangien erfolgte meistens von der 2.—4. Segmentzelle unterhalb der Scheitelzelle des Fadens an. Oft standen hier 2—6 Sporangien hintereinander, die jedoch — soweit beobachtet werden konnte — immer in ihrer Entwicklung verschieden weit fortgeschritten waren.

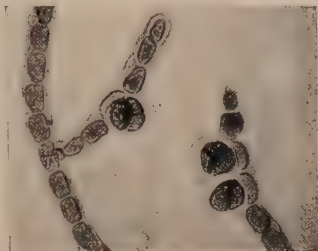


Abb. 11. Reife Tetrasporen in einer *Trailliella*-Laboratoriumskultur
Phot. Jan. 1948.



Abb. 12. a Reifes Tetrasporen von *Trailliella*, b desgl., Freiwerden der Tetrasporen, c desgl., mit einer im Innern des Sporangiums ausgekeimten Tetraspore; fixiert ($\times 500$).

Von den in großer Anzahl gebildeten Tetrasporen starben viele in der Kultur noch vor der Entleerung ihrer Tetrasporen ab. Schon die

Erneuerung der Nährlösung oder eine geringe Standortsveränderung des Kulturgefäßes konnte jede Weiterentwicklung der Sporangien hemmen (häufig wurden dabei Abweichungen vom Normaltypus beobachtet) und diese schließlich zum Absterben bringen. Es ist nicht bekannt, ob diese überaus große Empfindlichkeit der sich entwickelnden Tetrasporangien auch am natürlichen Standort vorliegt und so möglicherweise mit den nur seltenen Funden von fruktifizierenden *Trailliella*-pflanzen im Zusammenhang steht.

3. Die Weiterentwicklung der Tetrasporen.

Alle Versuche, die Entwicklung eines einzigen Sporangiums zu verfolgen, scheiterten an der überaus großen Empfindlichkeit des

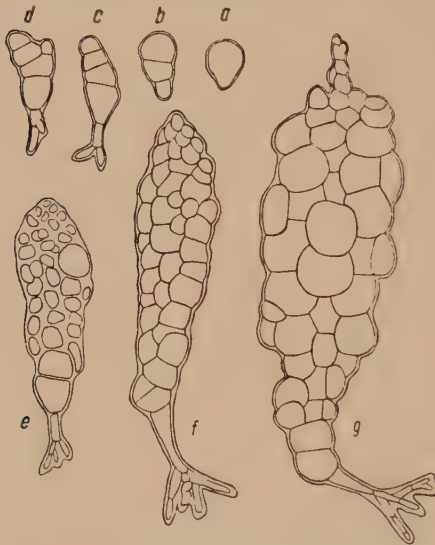


Abb. 13. a-g Entwicklungsstadien keimender Tetrasporen von *Trailliella*; bei g beginnende Verzweigung an der Spitze des Keimlings ($\times 200$). e fixiert.

völlig intakt, ohne daß es zu einem Aufreißen der Sporangienmembran gekommen war. Dennoch gelang es, Keimlinge aus den Tetrasporen zu erhalten und ihre bisher noch unbekannte Entwicklung zu verfolgen, da nämlich ein Teil der Tetrasporen aus den aufgehängten Algenbüscheln auf den Boden des Kulturgefäßes fiel und nun auf den zu diesem Zweck dort ausgelegten Deckgläsern auszukeimen begann. Die Deckgläser wurden dann herausgenommen, und es konnten jetzt die einzelnen Phasen der Weiterentwicklung der Tetrasporen beobachtet werden.

Zunächst bildete sich eine papillenartige, mit nur wenigen Chromatophoren versehene Ausstülpung (Abb. 13a), die dann als späteres Rhizoid durch eine transversale Wand abgeschieden wurde. Während sich nun

reife Tetrasporangium gegenüber Änderungen der Umweltbedingungen. Zwar gelang es, wenigzellige *Trailliella*-fäden, an denen Tetrasporangien saßen, zu isolieren und weiterzukultivieren, jedoch konnte an ihnen niemals die Entleerung der Sporangien beobachtet werden, obgleich die Außenbedingungen, wie Lichtintensität, Temperatur und Zusammensetzung der Nährlösung in vielfacher Weise variiert wurden. In den meisten Fällen wuchsen solche Algenfäden gut weiter, bildeten Verzweigungen aus, und nach mehreren Wochen lag das zu untersuchende Tetrasporangium inmitten eines kleinen Algenbüschels, manchmal abgestorben, häufig aber noch

das Rhizoid verlängerte und neue Zellen sowie zumeist auch einige Verzweigungen bildete, entstanden am apikalen Pol der noch immer dunkelrot gefärbten Tetraspore durch transversale Wände nacheinander mehrere Zellen (Abb. 13b, c), von denen die an der Spitze gelegene zur Scheitelzelle wird. Schon nach dem 3. bis 4. Teilungsschritt am apikalen Pol begannen die zuerst gebildeten Segmentzellen seitlich an ihrem oberen Ende neue Zellen abzuteilen (Abb. 13d). Im Laufe weiterer Entwicklung entstand dann ein vielzelliger, mehr oder weniger abgeflachter Thallus, der sein Längenwachstum mittels der Scheitelzelle fortsetzte, unter gleichzeitiger Ausbildung weiterer Zellen zweiter, dritter und höherer Ordnung von den Segmentzellen aus (Abb. 13e, f). Nach mehreren Wochen hatte der Keimling eine durchschnittliche Länge von $300\ \mu$ erreicht. Der zunächst noch völlig undifferenzierte Thallus gestattete in diesem Zeitpunkt nur die Feststellung, daß sich im Gegensatz zu dem monosiphonen Algenfaden von *Trilliella intricata* ein völlig anders gestalteter Organismus entwickelte.

Der nächste Entwicklungsschritt zeigte dann am jungen Keimling das Auftreten von Seitenverzweigungen, deren Anlage an den Segment-

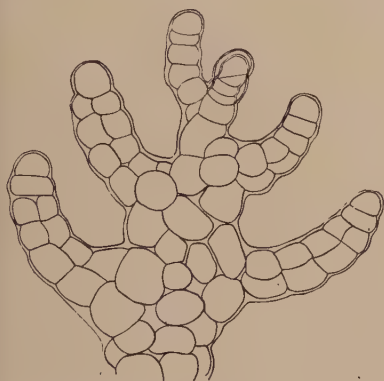


Abb. 14. Sproßspitze eines jungen Keimlings mit beginnender allseitiger Verzweigung ($\times 400$).

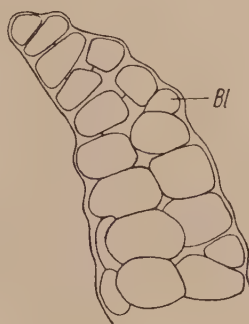


Abb. 15. Spitze eines jungen Kurztriebes mit Blaszelle (Bl). ($\times 600$).

zellen dicht unterhalb der Scheitelzelle erfolgte (Abb. 13g), jedoch in den meisten Fällen infolge der dichten Berindung der jungen Pflanzen nur schlecht zu erkennen war. Durch uhrglasförmige, nicht senkrecht zur Sproßachse stehende Querwände, die successive nach verschiedenen Richtungen geneigt waren, teilte die Scheitelzelle annähernd dreieckige Segmentzellen ab. An diesen entstand jeweils an der höheren Seite durch Abgrenzung einer weiteren Zelle eine Astanlage, deren Weiterwachstum ebenfalls durch eine Scheitelzelle erfolgte (Abb. 14). Die Stellung der so angelegten Verzweigungen — es handelt sich hier um Kurztriebe — erfolgte also spiralig um die Sproßachse. Eine bestimmte

Divergenz war nur schwer zu erkennen, sie liegt jedoch höher als $\frac{1}{4}$ (Abb. 16). Spätestens nach Erreichen des 4—5-Zellenstadiums eines neu angelegten Kurztriebes begannen dessen zuerst gebildete Segmentzellen durch Längswände in Richtung der Verzweigungsachse Perizentralzellen abzugliedern (Abb. 15). Die älteste dieser Zellen teilte dann häufig an ihrem oberen Ende eine kleinere Zelle ab, die sich zu einer Blasenzone (Bl) umwandeln konnte, wie sie auch am Tetrasporophyten auftrat. Nach Ausbildung der Perizentralzellen erfolgte dann von diesem aus die Berindung des sich weiter entwickelnden Kurztriebes. Wie zum Schutz legten sich die jungen Kurztriebe anfangs sichelförmig um die Sproßspitze; erst im Verlauf der weiteren Entwicklung streckten sie sich mehr nach außen. Nur in seltenen Fällen entstanden auch Langtriebe am Hauptsproß.

Die in dieser Weise aus den Tetrasporen heranwachsenden Pflanzen entwickelten sich nur langsam weiter und hatten nach drei bis vier Monaten erst eine Länge von wenigen Millimetern erreicht. Nach 8—9 Monaten waren im ersten Versuchsjahr jedoch mehrere Pflanzen über 2 cm groß geworden. Ihre anatomische Differenzierung und habituelle Entwicklung war nun so weit fortgeschritten, daß die sich entwickelnden Pflanzen endgültig als *Bonnemaïsonia hamifera* Hariot¹ identifiziert werden konnten. Diese Feststellung erhärtete sich, als auch im 2. und 3. Versuchsjahr (Ende Dezember 1947 und 1948) abermals Tetrasporen in den Kulturen gebildet wurden und die aus ihnen entstehenden Keimlinge sich in gleicher Weise entwickelten.

C. Der Gametophyt *Bonnemaïsonia hamifera* Hariot.

1. Anatomie.

Die Identifizierung der aus den Tetrasporen von *Trailiella intricata* sich entwickelnden *Bonnemaïsonia hamifera* war durch die Beschreibungen und Abbildungen von HARIOT (1891), BUFFHAM (1896), OKAMURA (1921), KYLIN (1928), CHEMIN (1929) und HAMEL (1930/31) möglich. Außerdem stand Herbariummaterial von *Bonnemaïsoniaceen* von den Botanischen Instituten Göttingen und Kiel, von Herrn Prof. KYLIN in Lund und vom Britischen Museum in London zur Verfügung². *Bonnemaïsonia hamifera* war allerdings nur in dem Kieler Material, das von HOLMES und GEORGE an der Südküste Englands gesammelt worden war, enthalten.

Im Gegensatz zu dem einfachen anatomischen Bau der monosiphonen *Trailiella* besteht *Bonnemaïsonia hamifera* aus einem reich verzweigten (Lang- und Kurztriebe stehen am Hauptsproß in $\frac{2}{3}$ s Stellung) und stark be-berindeten Thallus, der am natürlichen Standort eine Höhe von 6—20 cm erreichen kann. Auffallend sind bei dieser Rotalge die charakteristischen, hakenförmig umgewandelten Kurztriebe, die wahrscheinlich der vegetativen

¹ Diese Alge erscheint in der Literatur auch unter dem Namen *Asparagopsis hamifera* (Hariot) Okamura, wird aber zuletzt von J. u. G. FELDMANN (1942) wieder mit ihrem ursprünglichen Namen *Bonnemaïsonia hamifera* Hariot bezeichnet.

² Allen Stellen, die die Untersuchungen durch Verleihung von Herbariummaterial unterstützten, sei auch an dieser Stelle bestens gedankt.

Vermehrung dienen (u. a. CHEMIN 1929), sowie die bereits bei *Trailiella* erwähnten Blaszellen, die hier zwischen den Rindenzellen häufig über den ganzen Thallus verstreut liegen. Die rundlichen Cystocarprien (*Bonnemaisonia hamifera* ist diözisch) können — anscheinend bei Ausbleiben der Befruchtung — bis zu 2 mm groß werden (sterile Pseudocystocarprien, vergl. BUFFHAM 1896, KYLIN 1928). Angeblich sollen nach SETCHELL und GARDNER (1903) auch Tetrasporangien vorkommen, jedoch sind weder bei diesen Autoren noch in der gesamten übrigen Literatur hierüber nähere Beschreibungen oder Angaben zu finden.

2. Entwicklung der im Laboratorium kultivierten Pflanzen.

Die Aufzucht und Dauerkultur von *Bonnemaisonia hamifera* unter Laboratoriumsbedingungen gestaltete sich wesentlich schwieriger als die von *Trailiella intricata*. Dennoch gelang es, einen Teil der am Nordostfenster und im Dunkelmzimmer unter konstanten Licht- und Temperaturbedingungen (Apparatur B, Temperatur $15,0^{\circ} \pm 1,0^{\circ} \text{C}$, Lichtintensität 1200 MK) bei täglich 14stündiger Belichtung dauer stehenden Pflanzen bis zur Bildung von weiblichen Geschlechtsorganen zu kultivieren. An den 7—8 Monate alten, bis zu mehreren Zentimetern großen Pflanzen bildeten sich an den Langtrieben in unregelmäßigen Abständen einzelne 1—2 mm große, kurzgestielte Cystocarprien aus (Abb. 16), in denen niemals Karposporen gefunden wurden (Pseudocystocarprien). Antheridien konnten bis heute an keiner Pflanze beobachtet werden.



Abb. 16. Langtrieb mit Pseudocystocarprien von *Bonnemaisonia hamifera*. Phot. August 1947.

Während die in den Laboratoriumskulturen aufwachsenden jüngeren Pflanzen mit der Spiralstellung ihrer Kurztriebe (Abb. 17), der dichten Berindung sowie Ausbildung von Blaszellen (Abb. 18) dem oben geschilderten Habitus der am natürlichen Standort vorkommenden *Bonnemaisonia hamifera* weitestgehend entsprachen, veränderten sich die älter werdenden Exemplare oft erheblich in ihrem anatomischen Aufbau infolge z. T. noch unkontrollierbarer Außenbedingungen.

Im Gegensatz zu den Vergleichspflanzen des Herbariums zeigten sie gestauchten, wesentlich gedrungeneren Wuchs mit stark berindeten Kurz- und Langtrieben, wobei sich jedoch trotz oft bizarrer Form immer wieder der Grundtypus der spiraligen Anordnung der Verzweigung erkennen ließ.



Abb. 17. Sproßspitze einer jungen *Bonnemaisonia*-pflanze. ($\times 36$).

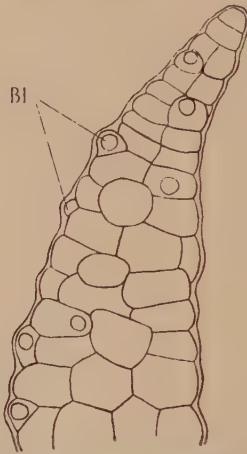


Abb. 18. Älterer Kurztrieb von *Bonnemaisonia hamifera* mit Blaszellen (Bl). ($\times 400$).

malen den ursprünglichen Aufbau erkennen ließen. Die unvollständige Ausdifferenzierung älterer Pflanzen bedingte sehr wahrscheinlich auch das Ausbleiben einer typischen Hakenbildung; auch die von BUFFHAM (1896) und CHEMIN (1929) beschriebenen bis zu 20μ langen, dornartig gekrümmten Zellen an der Spitze der Kurztriebe konnten nur in seltenen Fällen gefunden werden.

Bonnemaisonia hamifera zeigte, wie *Trailliella intricata*, starkes Regenerationsvermögen einzelner Thallusteile. Junge Langtriebe, die in den Kulturen als Verzweigungen an den stark verdickten Sprossen älterer Pflanzen entstanden waren, wurden dicht oberhalb des Muttersprosses abgetrennt und in neue Kulturgefäße übertragen. Infolge Kontaktreizes mit dem Boden der Kulturschale bildeten die anscheinend in dieser Beziehung sehr empfindlichen Schnittstellen sehr bald Rhizoide aus, welche die abgeschnittenen Langtriebe auf der Unterlage befestigten, so daß bei ihrer Weiterentwicklung neue Pflanzen entstanden. Auf diese Weise gelang es, neben neuen Aufzuchten aus den Tetrasporen, das sehr empfindliche Gametophytenmaterial vegetativ immer wieder zu ergänzen.

Auch an den verdickten Sprossen der älteren Pflanzen entstanden, z. T. durch enge Berührung mit dem Boden des Kulturgefäßes oder mit dem als Aufhängevorrichtung dienenden Glashaken einzelne oder in Büscheln stehende rhizoidartige Hyphen, die teils zur Befestigung des Algensprosses am Substrat dienten, teils als freie Hyphenenden sich bis zu $1/10$ mm Länge entwickelten.

Wachstum gehemmte Sprosse, die besonders im Sommer bei

Raumtemperaturen über $20,0^{\circ}\text{C}$ entstanden, bildeten häufig im Herbst oder im darauffolgenden Frühjahr wieder neue Lang- und Kurztriebe aus, die sich zunächst völlig normal entwickelten, später aber oft gleichfalls das gestauchte Wachstum zeigten. Auf diese Art entwickelten sich nach längerer Zeit unregelmäßig verzweigte, über zentimetergroße Algenbüschel (Abb. 2), die zwar der fiedrigen Wuchsform der am natürlichen Standort vorkommenden Pflanzen kaum mehr entsprachen, jedoch in jeder Neuanlage von Lang- und Kurztrieben und in ihren anatomischen Hauptmerk-

Ähnliche Vorgänge sind auch schon von CHEMIN (1929) an *Bonnemaisonia hamifera* und von SVEDELIUS (1933) und BOERGESEN (1919) an *Asparagopsis armata* bzw. *taxiformis* beschrieben worden.

Solche verzweigten oder unverzweigten Hyphen bestanden zumeist aus ungleich großen Zellen, die nur wenige Chromatophoren enthielten. Blasen zellen wurden an ihnen bis heute nicht gefunden. Wo Rhizoidhyphen zur Befestigung abgetrennter Sproßteile am Boden des Kulturgefäßes entstanden waren, entwickelten sich einige der freien, nicht mit dem Substrat verbundenen Hyphenenden unter Umständen zu neuen Gametophyten heran. Ihre Endzellen oder auch mitten im Thallus gelegene Zellen teilten sich anscheinend unvermittelt durch schräg gestellte Wände weiter (Abb. 19 a—d) und ließen mehr oder weniger differenzierte Thalli entstehen, die bei



Abb. 19. Umbildung einzelner Rhizoidhyphen zu Gametophytenanlagen a ($\times 220$), b ($\times 800$ c fix. ($\times 800$), d fix. ($\times 650$).

weiterer Entwicklung alle Übergänge bis zur normalen Ausbildung eines jungen Gametophyten zeigten.

Abgetrennte und isolierte Hyphenenden waren wider Erwarten lebensfähig. Ihr Weiterwachstum erfolgte zwar nur sehr langsam, dennoch entstanden nach $1\frac{1}{2}$ Jahren bis zu 5 mm große, polsterartig dem Boden des Kulturgefäßes fest angeheftete Büschel. Erst von diesem Zeitpunkt an bildeten sich an einigen wenigen Stellen solcher Büschel undifferenzierte Gewebepartien, die anscheinend die anomale Anlage eines neuen Gametophyten darstellten. Die ursächlichen Zusammenhänge dieser Erscheinungen sind noch recht undurchsichtig. Man könnte vermuten, daß irgend ein jeweils verschieden starker formativer Einfluß von der Mutterpflanze ausgeht, der anscheinend erst nach Anheftung des gesamten Komplexes Muttersproß/Rhizoidhyphen am Substrat zur Wirkung kommt.

Ob bei *Bonnemaisonia asparagoides* die Umwandlung der Hyphen auswachsender Karposporen zu neuen Gametophyten auf ähnliche Vorgänge zurückzuführen ist, bleibt noch näher zu untersuchen, um möglicherweise so die andersartige Sporenkeimung dieser *Bonnemaisoniaceae* (KYLIN 1945, FELDMANN 1946) zu erklären.

D. Physiologische Beobachtungen.

1. *Trailiella intricata*.

In den Tageslichtkulturen, die während des ganzen Jahres auf Tischen vor dem Nordwest- und Nordostfenster standen und den jahreszeitlichen Schwankungen von Licht und Temperatur des Arbeitsraumes unterworfen waren, zeigten sowohl die alten Stammkulturen wie frisch isolierte junge Fäden von *Trailiella intricata* bis auf die Wintermonate nahezu konstantes Wachstum. Der geringste Zuwachs war in allen Versuchsjahren vom November bis Februar, dessen Ursache wohl hauptsächlich die geringe winterliche Lichtintensität und Tageslänge sein dürfte.

a) Die vegetative Vermehrung von *Trailiella intricata* war erstaunlich stark. Frisch abgetrennte wenigzellige Fadenenden wuchsen unter Tageslichtbedingungen in 8–12 Wochen bis zu 0,5 cm großen Algenbüscheln heran. Sogar einzelne Fadensegmentzellen konnten zu neuen Pflanzen auswachsen. Die graphische Darstellung in Abb. 20

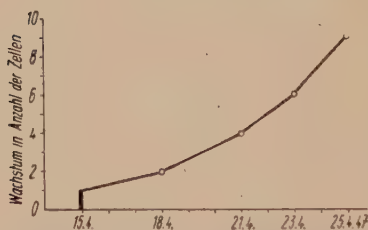


Abb. 20. Zuwachs einer einzelnen isolierten Fadensegmentzelle von *Trailiella* im Tageslicht bei $17 \pm 2.0^\circ \text{C}$. Versuch No. 204 vom 15. 4.—25. 4. 1947.

zeigt den Zuwachs aus einer isolierten Fadensegmentzelle (in einem Hohlsliffobjektträger), aus der bereits nach 10 Tagen ein neunzelliger Algenfaden entstanden war. Nach zwei Monaten war dieser, nach Übertragung in ein größeres Kulturgefäß, zu einem etwa 3 mm großen Algenbüschel herangewachsen.

b) Zur Untersuchung der Abhängigkeit des Wachstums von verschiedenen Lichtintensitäten wurden mehrfach 10–15-zellige unverzweigte Fadenenden in mit je 10 ccm Nährlösung gefüllte Esmarschalen gebracht. Sie wurden unter der gekühlten elektrischen Lampe (Apparatur A) so aufgestellt, daß die Schalen 1500 bzw. 500 bzw. 80 MK. erhielten. Die tägliche Belichtung dauerte 14 Stunden, die Temperatur wurde auf 15°C gehalten. Mit steigender Lichtintensität nahm das Wachstum unter gleichzeitiger Zunahme der Anzahl der Verzweigungen zu (Abb. 21). Zum Vergleich wurden keimende Zygoten einer Helgoländer Starklicht-*Enteromorpha* mit *Trailiella intricata* in einen gemeinsamen Versuch gebracht, dessen Ergebnis aus Abb. 22 ersichtlich ist. Während *Trailiella* sich noch bei 50 MK, wenn auch langsam, entwickelte, und bei 300 MK nach 12 Tagen (absolut gewertet) bereits durchschnittlich 100 neue Zellen gebildet hatte, fand bei *Enteromorpha* in der niedrigsten Intensitäts-

stufe überhaupt kein Wachstum mehr statt, und auch bei 300 MK zeigten sich gerade nur die ersten Querwände an den auswachsenden Zygoten. Erst bei 1500 MK war bei *Enteromorpha* die Entwicklung relativ ebenso gut wie die von *Trailliella*: es entstanden langfädige Thalli, deren reife

Gametangien nach 5—6 Wochen zum Schwärmen kamen. Wurde die Lichtintensität bis auf 10 000 MK gesteigert, nahm das Wachstum beider Algen weiterhin zu. *Trailliella* bildete in kurzer Zeit normale, wenn

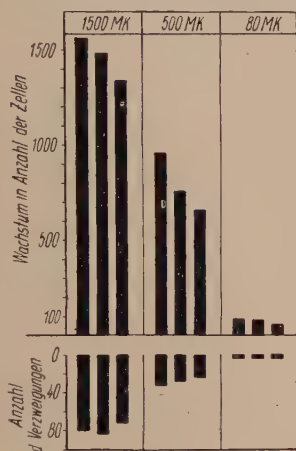


Abb. 21. Wachstum von je drei *Trailliella*-Pflanzen bei 1500, 500 und 80 MK. Versuch No. 285 vom 4. 5. —8. 6. 1947 (35 Tage) bei $15 \pm 1,0^\circ \text{C}$. Belichtungsdauer täglich 14 Std. elektrisches Licht.

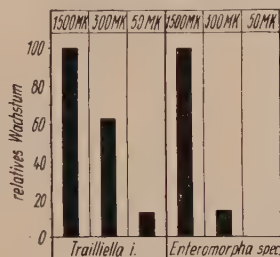


Abb. 22. Das relative Wachstum von *Trailliella* und *Enteromorpha spec.* (Keimlinge) bei 1500, 500 und 50 MK. Ordinate: Wachstum (Zuwachs in Zellen). Versuch No. 285 vom 18. 4.—24. 4. 1948 (12 Tage) bei $16,0^\circ \text{C}$. Elektrisches Dauerlicht.

auch nur schwach gefärbte, bis zu 0,5 cm große Büschel, und *Enteromorpha* wuchs jetzt zu mehrere Zentimeter langen Thalli heran, die nach etwa drei Wochen schon die ersten Gametangien bildeten.

Im schwachen Licht war *Trailliella* also deutlich überlegen, während in den höheren Lichtbereichen beide Algen nahezu gleich gutes Wachstum zeigten.

c) Die Versuche über den Einfluß der Temperatur wurden bei 12 , 16 und 24°C gemacht. Bei allen drei Temperaturen wuchsen die wenigzelligen *Trailliella*-Fäden innerhalb 5—6 Wochen zu kleinen Algenbüscheln heran; bei $16,0^\circ \text{C}$ war der Zuwachs am besten (Abb. 23). Auch die Zahl der Verzweigungen war bei der mittleren Temperatur am höchsten, unterschied sich jedoch nicht übermäßig von der in den übrigen Temperaturstufen. Danach scheint die Anlage von Verzweigungen mehr licht- als temperaturabhängig zu sein.

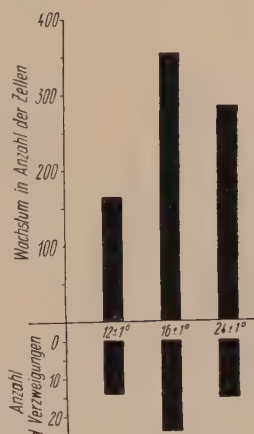


Abb. 23. Wachstum von *Trailliella* bei 12 , 16 und 24°C . Versuch No. 225 vom 28. 11. —8. 12. 1947 (10 Tage). Belichtung 1200 MK, täglich 12 Std.

d) Zur Prüfung der Wärmeresistenz kamen bis zu 1 cm große *Trailiella*-büschel in Erlenmeyerkolben mit je 100 cm Seewasser und wurden in einen abgedunkelten Thermostaten mit höherer Temperatur gestellt; nach 24 Stunden wurden die Algen wieder in den 18,0–20,0° C warmen Arbeitsraum gebracht. Der Versuch wurde zweimal, nämlich im Sommer und im Winter mit Material aus Tageslichtkulturen vom Nordostfenster durchgeführt.

Die Resistenzbreite lag (Tab. I) zwischen 27,0° und 30,0° C, wobei das Wintermaterial eine auffallend größere Wärmeempfindlichkeit zeigte. Die jahreszeitlich unterschiedlichen Außenbedingungen (vor allem wohl Temperatur und Licht) scheinen also einen gewissen Einfluß auf die im wesentlichen konstitutionell gegebenen Plasmaeigenschaften zu haben.

An sich entspricht die Resistenzbreite des im Laboratorium herangezogenen Materials den Werten, die BIEBL (1939), der die Wärmeresistenz verschiedener Helgoländer Meeresalgen, darunter auch *Trailiella*, untersucht hat, für die Algen der litoralen und sublitoralen Zone angibt.

Tabelle I. Wärmeresistenz von *Trailiella intricata*. Versuchsdauer 24 Stunden.

	+ 27,0° C	+ 28,0° C	+ 30,0° C	+ 30,0–35,0° C
Winterform (Febr. 1948)	lebend	z. T. abgestorben	abgestorben	—
Sommerform (Juli 1948)	lebend	lebend	lebend	abgestorben

e) Die Kälteresistenz von *Trailiella*-Freilandpflanzen ist schon von KYLIN (1917) ermittelt worden. Eigene Versuche mit Kulturmateriale wurden nach der gleichen Methode vorgenommen. Kleine Büschel (bis 1/2 cm Durchmesser) wurden in Seewasser auf – 2,9° C und – 3,9° C abgekühlt und nach dem Auftauen im Versuchsraum (Raumtemperatur durchschnittlich + 5,0° C) am darauffolgenden Tag mikroskopisch untersucht. Die Ergebnisse mehrerer Versuchsreihen stimmten mit den von KYLIN gefundenen Werten darin überein, daß *Trailiella* bei Eisbildung des umgebenden Seewassers schon nach wenigen Stunden bei – 2,9° C abstirbt.

Tabelle II. Kälteresistenz von *Trailiella intricata* (5. 3. 1948).

	– 2,9° C		– 3,9° C	
nach	eingefroren	unterkühlt	eingefroren	unterkühlt
1 Std.	lebend		leicht geschädigt	
2 Std.	leicht geschädigt		teilweise abgestorben	
3 Std.	stark geschädigt		abgestorben	
6 Std.	abgestorben			lebend
12 Std.		lebend		

Aus den in Tabelle II zusammengestellten Ergebnissen geht außerdem hervor, daß — wie auch KYLIN betont — ein Erfrieren der Alge erst nach

vorhergehender Eisbildung zu beobachten ist. So wirkte ein Aufenthalt in unterkühltem Seewasser von $-2,9^{\circ}$ auch nach 12 Stunden noch nicht schädigend. Selbst in unterkühlten Lösungen bis zu $-5,0^{\circ}$ blieb *Trailiella* noch nach mehrstündiger Versuchsdauer am Leben.

In Bezug auf die Kälteresistenz schien eine unterschiedliche Vorbehandlung der Versuchsalgen ohne Einfluß zu sein. Sowohl Tageslichtmaterial des geheizten Arbeitsraumes ($+18^{\circ}\text{C}$) wie Algenmaterial von Kulturen, die während der Wintermonate in einem schwach geheizten, nach Norden zu ebener Erde gelegenen Gewächshaus standen ($+4,0-8,0^{\circ}\text{C}$), verhielten sich, abgesehen von einigen individuellen Verschiedenheiten, in allen angesetzten Versuchsreihen gleich.

2. *Bonnemaisonia hamifera*.

Literaturangaben über das physiologische Verhalten von *Bonnemaisonia hamifera* liegen außer einigen wenigen Hinweisen über örtliches und zeitliches Vorkommen unter Berücksichtigung einiger ökologischer Faktoren nicht vor. Wie bereits erwähnt, entwickelte sich *Bonnemaisonia hamifera* in den Laboratoriumskulturen nur langsam; sie erreichte niemals die am natürlichen Standort beobachtete Größe und Wuchsform. Die nachstehend geschilderten licht- und temperaturphysiologischen Untersuchungen gestalteten sich daher auch wesentlich schwieriger als bei *Trailiella*.

a) Der junge, aus den Tetrasporen sich entwickelnde Gametophyt zeigte bei $15,0 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ und einer Lichtintensität von 300 MK normales, wenn auch nur langsames Wachstum. Bei Versuchen, ihn bei gleichbleibender Temperatur unter höheren Lichtintensitäten (1500 bis 2500 MK) zu schnellerer Entwicklung zu bringen, starb über die Hälfte der Algen ab, die restlichen Pflanzen wiesen schon nach kurzer Zeit erhebliche morphologische Veränderungen auf. Diese Lichtempfindlichkeit der jungen *Bonnemaisonia*-pflanzen mag mit dem Verhalten der keimenden Karposporen von *Bonnemaisonia asparagoides* in Einklang stehen, die bei den Untersuchungen von KYLIN (1945, S. 2) „in einem ziemlich dunklen kühlen Kellerraum“ im Verlauf von 8 Monaten bis zu 2 mm großen neuen *Bonnemaisonia*-pflanzen heranwuchsen.

Ältere Pflanzen von *Bonnemaisonia hamifera* verhielten sich gegen Steigerungen der Lichtintensität merklich unempfindlicher. So fand beim Tageslichtmaterial durch die jahreszeitlich bedingte Verstärkung der Lichtintensität bis in den frühen Sommer hinein keine sichtliche Hemmung des Wachstums statt. Dagegen zeigten Pflanzen, die bei 14stündiger Beleuchtung und einer Lichtintensität von 2500 MK im Lichtkasten standen, schon bald stark morphologische Veränderungen. Es wurden deshalb für Kulturen bei künstlicher Beleuchtung nur bis zu 1200 MK mit 12stündiger Lichtdauer benutzt.

b) Von Temperaturen erwiesen sich vor allem solche oberhalb $20,0^{\circ}\text{C}$ als wachstumshemmend. Schon in den Tageslichtkulturen konnte immer wieder beobachtet werden, daß ein Anstieg der Raumtemperatur für kurze Zeit über $20,0^{\circ}\text{C}$ die Entwicklung merklich hemmte, das Scheitelzellenwachstum der Lang- und Kurztriebe

schließlich zum Stillstand brachte und die bereits erwähnten (S. 646) anatomischen Veränderungen der Alge zur Folge hatte. Experimentelle Untersuchungen bei konstantem elektrischen Licht in der Apparatur B

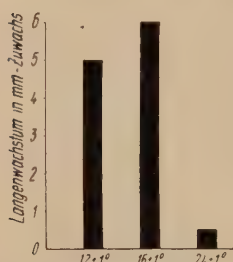


Abb. 24. Wachstum von *Bonnemaisonia hamifera* bei 12, 16 und 24° C. Versuch No. 226 vom 28. 11.—29. 12. 1947 (31 Tage), Belichtung 1200 MK, täglich 12 Std.

(Hängekulturen von jungen, bereits verzweigten Algen aus Tageslichtkulturen) ergaben ein ähnliches Resultat (Abb. 24). Das Optimum lag wie bei *Trailiella* um 16,0° C. 12,0° C hemmte die Weiterentwicklung nur wenig, während eine Temperatur um 24,0° C eine sichtliche Wachstumshemmung unter starker Berindung des Thallus bewirkte.

c) Bei den Wärmeresistenzversuchen (Tab. III) zeigte sich der Gametophyt merklich empfindlicher als der Tetrasporophyt. Sogar das Sommermaterial starb nach mehrstündigem Aufenthalt in Seewasser von +30,0° C ab, während die Pflanzen der Winterkulturen bereits bei +27,0° C nach 24stündiger Versuchsdauer die ersten Schädigungen aufwiesen.

Tabelle III. Wärmeresistenz von *Bonnemaisonia ham.* Versuchsdauer 24 Stunden

	+ 27,0° C	+ 28,0° C	+ 30,0° C
Winterform (Febr. 1948)	teilweise geschädigt	abgestorben	—
Sommerform (Juli 1948)	lebend	lebend	abgestorben

d) Bei den Kälteresistenzversuchen ergaben sich ähnliche Resultate wie bei *Trailiella intricata* (Tab. IV). Auch hier ist auffallend, daß eine 12stündige Unterkühlung des Seewassers auf —2,9° C ohne Schädigung ertragen wurde. Aus dem Vergleich mit den Untersuchungsergebnissen von BIEBL (1939) an einigen Neapler Rotalgen, die bei Temperaturen um 0° C ohne Eisbildung bereits abstarben, kann deshalb gefolgert werden, daß *Bonnemaisonia hamifera* wie auch *Trailiella intricata* infolge ihres temperaturphysiologischen Verhaltens nicht zu den typischen südlichen Algenformen zu stellen sind.

Tabelle IV. Kälteresistenz von *Bonnemaisonia ham.* (5. 3. 1948).

nach	— 2,9° C		— 3,9° C	
	eingefroren	unterkühlt	eingefroren	unterkühlt
1 Std.	lebend		leicht geschädigt	
2 Std.	leicht geschädigt		teilweise abgestorben	
3 Std.	stark geschädigt		abgestorben	
6 Std.	abgestorben			lebend
12 Std.		lebend		

II. Besprechung der Ergebnisse.

1. Der Generations- und Kernphasenwechsel bei den *Bonnemaisoniaceen*.

Erst kürzlich haben J. u. G. FELDMANN (1942) als erste bei einigen Vertretern der *Bonnemaisoniaceen* einen Generationswechsel nachweisen können. Aus den Karposporen von *Bonnemaisonia asparagoides* Woodw. und *Asparagopsis armata* Harv. wuchsen in ihren Kulturen völlig anders als der Gametophyt gestaltete Pflanzen heran. Danach gehört der bislang als eigene Gattung unter die *Ceramiales* gestellte Thallus von *Hymenoclonium serpens* (Crouan) Batters als Tetrasporenpflanze in den Entwicklungskreis von *Bonnemaisonia asparagoides*, und *Falkenbergia rufolanosa* Harv. (*Rhodomelaceae*) stellt den Tetrasporophyten von *Asparagopsis armata* dar. In beiden Fällen beobachteten die Verfasser zwar keine Tetrasporen an dem aus den Karposporen gezüchteten Algenmaterial, da aber *Hymenoclonium* wie *Falkenbergia* am natürlichen Standort von ihnen mit Tetrasporangien gefunden wurden, glauben sie, besonders auch bei Berücksichtigung der gemeinsamen geographischen Verbreitung, einen geschlossenen Entwicklungskreis von Gametophyt und Tetrasporophyt bei den untersuchten Algen annehmen zu dürfen.

Demgegenüber gelangte KYLIN (1945) bei einer Nachprüfung der Ergebnisse von J. u. G. FELDMANN zu einem ganz anderen Ergebnis. Die Karposporen von *Bonnemaisonia asparagoides* wuchsen bei ihm zwar auch zu Pflanzen aus, die offenbar mit *Hymenoclonium serpens* identisch sind, die aber dann im Laufe weiterer Entwicklung unter Umbildung einzelner Endzellen rein vegetativ neue Gametophyten entstehen ließen. KYLIN meint deshalb, daß die von FELDMANN in der Natur gefundenen Tetrasporangien von *Hymenoclonium serpens* nicht als solche zu deuten seien, sondern daß es sich auch hier um umgebildete Endzellen handelt, die neue Gametophytenanlagen darstellen. Er hält *Hymenoclonium serpens* daher nicht für einen Tetrasporophyten, sondern für eine Art „Protonema“.

Diese Stellungnahme KYLINS zum Problem des Generationswechsels bei *Bonnemaisonia asparagoides* ist schon deshalb besonders bedeutsam, weil J. u. G. FELDMANN weder den Nachweis erbringen konnten, daß die in der Natur gefundenen Tetrasporenpflanzen aus Karposporen entstanden waren, noch die von ihnen kultivierten Exemplare von *Falkenbergia rufolanosa* und *Hymenoclonium serpens* Tetrasporen ausbildeten. Auch ist es ihnen nicht gelungen, aus den Tetrasporen der Freilandpflanzen die zugehörigen Gametophyten zu kultivieren, so daß auf jeden Fall — ganz abgesehen von den Versuchsergebnissen KYLINS — zunächst nur eine Seite des Entwicklungskreises, nämlich die Entwicklung vom Gametophyten zum Tetrasporophyten, bewiesen war, während die andere Seite, die Weiterentwicklung der Tetrasporen zu neuen Geschlechtspflanzen, ganz offen blieb.

Gerade diese Frage wird durch die vorliegenden Untersuchungen an *Trilliella intricata* für den Entwicklungskreis von *Bonnemaisonia*

hamifera eindeutig geklärt, womit gleichzeitig auch die nach den Versuchsergebnissen von KYLIN entstandenen Bedenken über den Generationswechsel der *Bonnemaisoniaceen* stark abgeschwächt werden. Wenn natürlich auch das Verhalten des eigenen Kulturmateriels nichts über die von J. u. G. FELDMANN ausgeführten Untersuchungen an den anderen Arten aussagen kann, so beweisen doch die Ergebnisse mit *Trailiella*, daß hier unzweifelhaft ein echter Tetrasporophyt vorliegt, dessen Tetrasporen zu Gametophyten auswachsen. Es kann sich dabei also keinesfalls um ein Protonema mit vegetativen Anlagen neuer Geschlechtspflanzen im Sinne KYLINS handeln. Damit gewinnt aber die von FELDMANN vertretene Ansicht, daß zumindest die in ihren Kulturen aus den Karposporen von *Asparagopsis armata* entstandenen Pflanzen Tetrasporophyten gewesen seien, wieder starke Wahrscheinlichkeit, so daß auch für den Entwicklungskreis von *Bonnemaisonia hamifera* / *Trailiella intricata* angenommen werden darf, daß der Tetrasporophyt aus den Karposporen entsteht³.

Der endgültige Beweis für den völlig geschlossenen Entwicklungskreis kann allerdings nur an japanischem Material erbracht werden, denn alle an den europäischen und ostamerikanischen Küsten vorkommenden Pflanzen von *Bonnemaisonia hamifera* sind — soweit bis heute bekannt ist — rein weiblich; eine Befruchtung ist also bei ihnen nicht möglich, und daher bilden sie auch keine Karposporen aus (BATTERS 1896, KYLIN 1928). An den atlantischen Standorten können demnach zwar aus den Tetrasporen neue Gametophyten entstehen, die dann aber keine Fortpflanzungsmöglichkeit mehr besitzen, für den Fortbestand der Art also reiner Luxus sind. Folglich haben auch hier die Tetrasporen keine Bedeutung für die Erhaltung der Art. Die Entstehung des Sporophyten aus dem Gametophyten ist deshalb an den atlantischen Küsten ausgeschlossen. Die so zahlreich in den europäischen und nordamerikanischen Gewässern auftretenden *Trailiella*-Pflanzen müssen sich also alle rein vegetativ vermehren. Das ist nach den vorliegenden Beobachtungen über die auffallend starke Regenerationsfähigkeit der Alge in den Laboratoriumskulturen und wahrscheinlich auch am natürlichen Standort (s. u. a. HYGEN und JORDE 1934, S. 34) auch durchaus verständlich.

Wo die Reduktionsteilung bei den Gattungen *Bonnemaisonia* und *Asparagopsis* stattfindet, ist weder von J. und G. FELDMANN noch in der vorliegenden Arbeit untersucht worden. Dagegen liegen ältere Ergebnisse von KYLIN (1916) und SVEDELIUS (1933) vor. Danach ist bei *Bonnemaisonia asparagoides* und *Asparagopsis armata* die erste Teilung des Zygotenkerns eine Reduktionsteilung, so daß die entstehenden Karposporen haploid sind. Der mit FELDMANN angenommene

³ Es sei weiter in diesem Zusammenhang auf die von J. u. G. FELDMANN (1942, S. 119) abgebildeten allerersten Entwicklungsstadien der bereits im Sporangium ausgekeimten Tetrasporen an Freilandmaterial von *Falkenbergia rufolanosa* hingewiesen, die eine große Ähnlichkeit mit gleichen Tetrasporenstadien von *Trailiella* zeigen (Abb. 12 c), so daß auch hierin eine gewisse Parallelität in der Entwicklung beider Algen zu erkennen ist.

gemeinsame Entwicklungskreis für *Bonnemaisonia asparagoides*/Hymenoclonium serpens und für *Asparagopsis armata*/Falkenbergia rufolanosa gehört somit nicht nur dem diplobiontischen Typus mit morphologisch

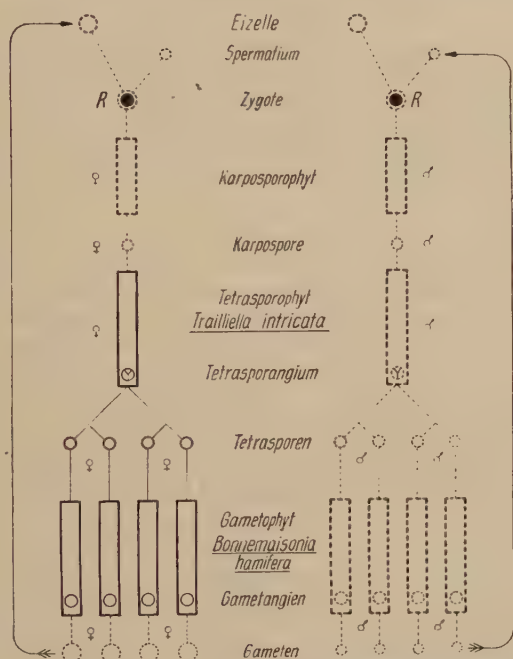


Abb. 25. Schematische Darstellung des Generations- und Kernphasenwechsels von *Bonnemaisonia hamifera*. Schwarz ausgefüllt = diploide Phase, weiß = haploide Phase. Stark umrandet = Ergebnis eigener experimenteller Untersuchungen, schwach umrandet = zunächst noch hypothetische Ergänzung auf Grund von Versuchsergebnissen an *Asparagopsis armata* (FELDMANN 1942) und *Bonnemaisonia asparagoides* (KYLIN 1916, SVEDELIUS 1933).

verschieden ausgebildeten Generationen an, sondern zeigt gleichzeitig eine zum ersten Mal beobachtete Haploidie in allen drei Gliedern des Generationswechsels (Gametophyt, Karpoporophyt, Tetrasporophyt).

Unter der Voraussetzung, daß bei *Bonnemaisonia hamifera* und *Bonnemaisonia asparagoides* nicht nur morphologisch (s. KYLIN 1928) sondern auch zytologisch gleiche oder zumindest sehr ähnliche Verhältnisse vorliegen, würde demnach auch *Trailliella intricata* zu den haploiden Tetrasporophyten gehören. Die eigenen Beobachtungen unterstützen eine solche Annahme insofern, als hier an den aus den Tetrasporen von *Trailliella* entstandenen *Bonnemaisonia*-Pflanzen, soweit sie Geschlechtsorgane ausbildeten, nur Cystocarprien beobachtet werden konnten. Das wäre ein Hinweis darauf, daß der nach einer zygotischen Reduktionsteilung aus den Karposporen hervorgehende Tetrasporophyt bereits sexuell — und zwar in diesem Fall weiblich — determiniert war.

Eine Gesamtdarstellung des Entwicklungskreises *Bonnemaisonia hamifera*/*Trailliella intricata* ergibt also in Anlehnung an die von J. u. G. FELDMANN gewonnenen Ergebnisse an *Asparagopsis armata*/*Falkenbergia rufolanosa* das Entwicklungsschema Abb. 25.

Eine wirkliche Bestätigung dieser eigenartigen Kernphasenverhältnisse kann jedoch erst durch zytologische Untersuchungen gegeben werden. Solche wurden auch unternommen, jedoch konnte bislang infolge der übergroßen Empfindlichkeit des Gametophyten in den Laboratoriumskulturen und seiner damit verbundenen Langsamwüchsigkeit noch kein brauchbares Material für Mitosepräparate gewonnen werden.

2. Die systematische Stellung von *Bonnemaisonia hamifera* Hariot.

Die wechselnde systematische Einordnung von *Bonnemaisonia hamifera* innerhalb der Familie der *Bonnemaisoniaceen* — zunächst zur Gattung *Bonnemaisonia* durch HARIOT (1896) und später zur Gattung *Asparagopsis* durch OKAMURA (1921) — ist erneut von J. u. G. FELDMANN (1942) auf Grund vergleichend anatomischer Betrachtungen diskutiert worden. Auch das vorliegende Untersuchungsergebnis, daß der Tetrasporophyt von *Bonnemaisonia hamifera* eine *Trailliella* ist, erlaubt keine endgültige Entscheidung, denn weder ist *Trailliella intricata* mit dem *Falkenbergia*-stadium von *Asparagopsis armata* und *tariformis* (Gattung *Asparagopsis*) noch mit dem *Hymenoclonium*-stadium von *Bonnemaisonia asparagoides* und *clavata* (Gattung *Bonnemaisonia*, vgl. FELDMANN 1942, S. 62 bzw. S. 142) identisch. Die Frage, ob tatsächlich bei den *Bonnemaisoniaceen* jede Gattung durch einen morphologisch einheitlichen Tetrasporophyten charakterisiert wird, und inwieweit innerhalb dieser Familie entwicklungsgeschichtliche Zusammenhänge (vgl. SVEDELIUS 1933) bestehen, läßt sich daher nur durch weitere experimentelle Untersuchungen beantworten.

3. Vergleichende Betrachtung des physiologischen Verhaltens und der geographischen Verbreitung von Tetrasporophyt und Gametophyt.

Bei der Bearbeitung der zahlreichen Literaturangaben über die geographische Verbreitung von *Bonnemaisonia hamifera* und *Trailliella intricata* ergibt sich, daß die beiden Algen in allen ihren Hauptverbreitungsgebieten des Atlantischen und Stillen Ozeans — abgesehen von einigen Ausnahmefällen — nebeneinander auftreten.

In beiden Weltmeeren liegen alle bis heute aufgezeichneten Funde von *Bonnemaisonia hamifera* in der Zone gemäßigter Wassertemperaturen (s. SCHOTT 1933, 1935). Bereits CHEMIN (1929) vermutete, daß *Bonnemaisonia hamifera* eine Alge „des régions tempérées et plutôt froides“ sei.

Der Tetrasporophyt *Trailliella intricata* überschreitet dagegen in Japan und in Europa wahrscheinlich infolge seiner größeren physiologischen Plastizität die Verbreitungsareale des Gametophyten in südlicher bzw. nördlicher Richtung. So zeigt z. B. sein Vorkommen in Süd-Japan (INAGAKI 1935, S. 43) und im Mittelmeer (FELDMANN 1942, S. 148), daß er sich im Gegensatz zum Gametophyten noch in Lebensgebieten ausgesprochen südlicher Formen mit Temperaturen bis zu 25.0° C halten kann.

Es ist deshalb zu vermuten, daß das im Laboratoriumsversuch beobachtete physiologische Verhalten von *Bonnemaisonia* und *Trailliella* — vor allem das beim Gametophyten wesentlich begrenzte Wachstum gegenüber verschiedenen Licht- und Temperaturbedingungen als beim Tetrasporophyten — den ökologischen Faktoren ihres natürlichen Standortes weitgehend entspricht.

Die mutmaßliche Heimat von *Bonnemaisonia hamifera* ist in der Literatur vielfach diskutiert worden (u. a. OKAMURA 1921, SAUVAGEAU 1925, CHEMIN 1929). Als ursprüngliches Verbreitungsgebiet kommt sowohl Japan wie auch die Westküste Nordamerikas in Betracht. Folgt man nun einer Auffassung SCHARFETTERS (1922), daß die Heimat einer Pflanze dort zu suchen sei, wo Vegetationszyklus und jahreszeitlicher Klimaverlauf miteinander parallel verlaufen, so ließ vor allem das temperaturphysiologische Verhalten von Gametophyt und Tetrasporophyt die Auffassung berechtigt erscheinen, die Heimat beider Algen in Japan zu suchen. Hier erreichen die Wassertemperaturen des Sommers einen Wert⁴, der — den Literaturangaben und den eigenen Laboratoriumsversuchen entsprechend — für das Wachstum des Gametophyten bereits zu hoch liegt, so daß vermutlich diese Jahreszeit vom Tetrasporophyten überbrückt wird. Die ausgeglichenen Wassertemperaturen an der Westküste Nordamerikas⁵ machen dagegen weit weniger eine temperaturgebundene Aufeinanderfolge von Gametophyt und Tetrasporophyt notwendig. Eine solche Auffassung setzt allerdings in beiden Fällen den jahreszeitlich abhängigen Wechsel von gametophytischer und tetrasporophytischer Generation voraus.

Auffallend ist, daß — wie in der Natur (BATTERS 1896, OKAMURA 1921, ROSENVINGE 1923/24, CHEMIN 1924) — so auch in den Laboratoriumskulturen der Gametophyt im Sommer und der Tetrasporophyt im Spätherbst Fortpflanzungsorgane ausbilden. Alle Versuche, im Laboratorium schon im Frühjahr oder Sommer unter abgeänderten, dem Spätherbst entsprechenden Außenbedingungen Tetrasporangien an den Algenbüscheln zu erhalten, scheiterten bislang. Das läßt einen gewissen jahreszeitlichen Rhythmus vermuten, wie ihn FELDMANN (1942, S. 137) auch für *Bonnemaisonia asparagoides* und *Hymenoclonium serpens* im Mittelmeer angibt und der auf Grund des temperaturphysiologischen Verhaltens beider Generationen bereits erwähnt wurde. Die Fähigkeit, sich innerhalb ihres Entwicklungskreises oder auch rein vegetativ zu vermehren, ermöglichte es dann *Bonnemaisonia hamifera* wie auch *Trailliella intricata* sich überall dort anzusiedeln, wo die ökologischen Faktoren des Standortes ihrer physiologischen Einstellung entsprachen.

Für die in Europa erst um 1890 erfolgte Einwanderung — *Bonnemaisonia hamifera* und *Trailliella intricata* sind nach den Angaben in der

⁴ Oberflächentemperatur (n. SCHOTT 1935, Tab. 20—23) für die Ostküste Japans (Awa-Hakodate): Febr. 0—12°, Mai 9—17°, Aug. 20—25°, Nov. 8—19° C.

⁵ Oberflächentemperatur (n. SCHOTT 1935) für die Westküste Nordamerikas (Friday Harbour.) Febr. 8°, Mai 10°, Aug. 14—15°, Nov. 9—10° C.

Literatur (u. a. SAUVAGEAU 1918, ROSENVINGE 1923/24, CHEMIN 1929, WESTBROOK 1930) vor dieser Zeit hier nicht bekannt gewesen — kann auf Grund der durch die vorliegenden Untersuchungen erschlossenen Zusammenhänge vielleicht angenommen werden, daß zunächst eine weibliche *Trailliella* eingeschleppt wurde, aus deren Tetrasporen dann weibliche Gametophyten entstanden sind. Damit fände auch die zeitliche Aufeinanderfolge des ersten Auftretens beider Algen an der englischen Südküste (1890/93) und nordamerikanischen Ostküste (1927/28) sowie das ausschließliche Vorkommen nur weiblicher Pflanzen im Atlantischen Raum eine gewisse Erklärung (s. a. FELDMANN 1942).

IV. Zusammenfassung der Ergebnisse.

1. *Trailliella intricata* Batters konnte jahrelang im Laboratorium kultiviert werden.
2. Als beste Nährlösung erwies sich Helgoländer Hochseewasser mit Zusatz einer Eisenzitrat-Schreiberlösung.
3. Die Alge zeigte in den Kulturen starke Regenerationsfähigkeit; wenigzellige Fadenenden (bis zu einer einzigen Fadensegmentzelle) wuchsen unter günstigen Außenbedingungen stets zu neuen Pflanzen heran.
4. Im Winter jedes Versuchsjahres bildeten sich an den zentimetergroßen Algenbüscheln Tetrasporangien aus, aus deren Tetrasporen sich *Bonnemaisonia hamifera* Hariot entwickelte.
5. Die Aufzucht von *Bonnemaisonia hamifera* war schwierig, jedoch gelang es, mehrere Zentimeter große Pflanzen bis zur Bildung von Geschlechtsorganen zu kultivieren.
6. In den Kulturen entstanden ausnahmslos sterile Cystocarprien (Pseudo-Cystocarprien).
7. *Trailliella intricata* Batters gehört also als Tetrasporophyt in den Entwicklungskreis von *Bonnemaisonia hamifera* Hariot.
8. In physiologischen Versuchen erwiesen sich das Wachstum und die Resistenz des Gametophyten gegenüber verschiedenen Licht- und Temperaturbedingungen wesentlich begrenzter als die des Tetrasporophyten.
9. Zwischen dem physiologischen Verhalten von *Bonnemaisonia hamifera* und *Trailliella intricata* und den ökologischen Faktoren ihrer natürlichen Standorte ist eine gewisse Parallelität nachzuweisen.

Herrn Professor Dr. R. HARDER danke ich herzlich für die Überlassung des Themas sowie für die ständige Unterstützung durch die Mittel seines Institutes bei der Ausführung der Untersuchungen.

Literatur.

BATTERS, E. A. L.: 1896. Some new British marine Algae. Journ. of Bot., **34**, 6. — 1900. New or critical marine Algae. Journ. of Bot., **38**, 369. — BIEBL, R.: 1939. Über die Temperaturrestistenz von Meeresalgen verschiedener Klimazonen und verschieden tiefer Standorte. Jahrb. wiss. Bot. **88**, 389. — BOERGESEN, F.: 1919. The marine Algae of the Danish West Indies. Part IV. Rhodophyceae 5. Dansk Bot. Arkiv, **3**. — 1930. Marine Algae from the Canary Islands. III. Rhodophyceae, Part III, Ceramiales. Biol. Medd. det Kgl. Dansk Vidensk. Selsk. **9**, No. 1. — BUFFHAM, T. H.: 1896. On *Bonnemaisonia* ham. Hariot in Cornwall. The Journ. of the Quekett microscopical club, II. ser., **6**, 177.

CHEMIN, E.: 1923. Flore algologique de Luc-Sur-Mer et environs. Annales des Sc. Nat. Bot., sér. V, **21**. — 1929. L'*Asparagopsis* hamifera (Hariot) Okamura. et son mode de multiplication. Revue algologique, **4**, 29.

FELDMANN, J. et G.: 1942. Recherches sur les *Bonnemaisoniaceae* et leur alternance de générations. Ann. des Sc. Nat. Bot., Sér. XI, **3**, 75. — 1946. A propos d'un récent travail du Prof. H. Kylin sur l'alternance de générations du *Bonnemaisonia asparagoides*. Bull. Soc. d'Hist. Nat. l'Afrique du Nord, **7**, 35.

HAMEL, G.: 1930—31. Floridées de France VI. Revue algol. **5**, 100. — HARIOT, P.: 1891. Liste des Algues marines, rapportées de Yokoska (Japon) par M. le Dr. Savatier. Mém. de la soc. nationale des sc. nat. et math. de Cherbourg, **27**. 3. sér., 223. — HYGEN, G. und JORDE, J.: 1934. Beitrag zur Kenntnis der Algenflora der norwegischen Westküste. Bergens Museums Årbok, Naturvidensk. rekke, No. 9.

INAGAKI, K.: 1935. Some marine Algae recently discovered in Japan and new to science. Scient. papers inst. algol. research Hokkaido imper. univ., **1**. No. 1, 41.

KYLIN, H.: 1915. Über die Blaszellen einiger Florideen und ihre Beziehung zur Abspaltung von Jod. Arkiv. f. Bot. **14**, No. 5, 1. — 1916. Über *Spermthamnion roseolum* (Ag) und *Trailliella intricata* Batt. Bot. Not., **83**. — 1917. Über die Kälteresistenz der Meeresalgen. Bot. Ber., **35**, 370. — 1922. Algologiska notiser från bohusländska kusten. Bot. Not., **343**. — 1925. The marine red Algae in the vicinity of the Biological Station at Friday Harbor Wash. Lunds Univ. Årsskrift N. F. Avd. 2, **21**, No. 9. — 1928. Entwicklungsgeschichtliche Florideenstudien. Lunds Univ. Årsskrift, N. F. Avd. 2, **24**, No. 4. — 1943. Über die Ernährung von *Ulva lactuca*. Fysiogr. Sällsk. Förhandl. **13**, No. 21. 1945. Über den Generationswechsel von *Bonnemaisonia asparagoides*. Fysiogr. Sällsk. Förhandl. **15**, No. 20.

LEVING, T.: 1937. Zur Kenntnis der Algenflora der norwegischen Westküste. Lunds Univ. Årsskrift N. F. Avd. 2, **33**, No. 8. — LEWIS, J. F. and TAYLOR, W. R.: 1928. Notes from the Wood Hole Laboratory. Rhodora **38**, 193; Ref.: Revue algolog. 1930/31, **5**, 254.

NEWTON, L.: 1931. A handbook of the British Seaweeds. (Zit.: Suneson. Bot. Not. 1939. 749).

OKAMURA, K.: 1921. *Icones of Japanese Algae*. 4, No. 7. Tokyo.

ROSENVINGE: 1923/24. The marine Algae of Denmark. Part III, Rhodophyceae III, (Ceramiales). Mém. Acad. roy. des sc. et lettres de Danemark. Sect. des sc., sér. 7, 8, No. 3.

SAUVAGEAU, C.: 1925. Sur quelques Algues Floridées renfermant de l'iode à l'état libre. Bull. stat. biol. d'Arcachon. 12, 5. — SCHOTT, G.: 1933. Geographie des Atlantischen Ozeans. — 1935. Geographie des Indischen und Stillen Ozeans. — SCHUSSNIG, Br.: 1927. Über die Entwicklung und die Funktion der Blasenellen bei den Florideen. Arch. f. Protokunde. 58, 201. — SEGAWA, S.: 1936. On the marine Algae of Susaki. Prov. Izu. and its Vicinity, II. Scient. papers inst. algol. research Hokkaido imper. univ., 1, No. 2, 175. — SETCHELL, W. A. and GARDNER, N. L.: 1903. Algae of Northwestern America. University of California Publications. Botany, 1. — SVEDELIUS, N.: 1933. On the development of *Asparagopsis armata* (Harv.) and *Bonnemaisonia asparagoides* (Woodw.) Ag. Nov. acta Reg. Societ. Scient. Upsaliensis, Ser. 4, 9, No. 1, 1.

TAYLOR, W. R.: 1937. Marine Algae of the northwestern coast of North America. Univ. of Michigan Stud., Scientific Series. 13. Ann. Arbor.

WESTBROOK, M. A.: 1930. Notes on the distribution of certain marine red Algae. Journ. of Bot., 68. 257.

(Aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen.)

Untersuchungen über die natürliche Mikroflora des Bodens¹.

Von

MARIA HOPF.

Mit 3 Textabbildungen.

(Eingegangen am 22. Februar 1949.)

Durch die hier mitgeteilten Untersuchungen sollte festgestellt werden, wie sich ein „Naturboden“ in mikrobiologischer Hinsicht von einem „Kulturboden“ unterscheidet (die ausführliche Darstellung siehe bei HOPF¹). Denn es war namentlich aus den Beobachtungen WINOGRADSKY'S² klar, daß der Kulturboden mehr oder weniger ein Kunstprodukt ist, in dem die Entwicklung bestimmter Mikroorganismen-typen durch die Kulturmaßnahmen (Düngung, Bearbeitung usw.) einseitig gelenkt wird. Als charakteristisch für ihn dürften die Mikroorganismen anzusprechen sein, in erster Linie stäbchenförmige Bakterien, die sich auf den allgemein üblichen Nährböden einstellen. Dazu kommen eine Reihe von Spezialtypen, unter denen sich z. B. *Azotobacter chroococcum* als typischer Kulturbegleiter erwiesen hat, der auch, ebenso wie *Nitrifikanten*, nur auf neutralen Böden vorkommt. Demgegenüber hatte WINOGRADSKY den Begriff der „autochthonen“ Mikroflora aufgestellt als der für vernachlässigte Böden sozusagen ursprünglichen Mikroflora, in der insbesondere Kokkenformen stark hervortreten. Da diese Formen noch ganz unvollkommen charakterisiert sind, erschienen weitere Untersuchungen erwünscht, außerdem sollte versucht werden, unmittelbar im Boden geschehene Mikroorganismen abzuimpfen, zu kultivieren und zu identifizieren.

Während WINOGRADSKY mit vernachlässigten (seit langem ungedüngten) Kulturböden arbeitete, wurde für die vorliegenden Untersuchungen ein Naturboden gewählt, der sich in seiner Beschaffenheit im übrigen aber nicht allzu weit von einem Kulturboden entfernen sollte. Da ein solcher in reinsten Form bei uns kaum mehr vorhanden ist, wurde ein Boden ausgesucht, der diesen Bedingungen noch am ehesten zu entsprechen schien: Ein auf Muschelkalk liegender Hang in einem Seitentälchen der Werra, links über dem Wege Werleshausen—Hanstein (unmittelbar jenseits des Bahn-

¹ Kurzer Auszug aus der gleichnamigen Dissertation von MARIA HOPF, mathematisch-naturwissenschaftliche Fakultät der Universität Göttingen, 1948. Über einige Ergebnisse wurde bereits berichtet: A. RIPPEL-BALDES Nachr. Akad. d. Wiss. Göttingen Mathem.-Physikal. Kl., S. 17, 1947.

² S. WINOGRADSKY: Ann. Inst. Pasteur **39**, 301 (1925); **40**, 455 (1926); Soil. Sc. **43**, 327 (1937).

dammes, Meßtischblatt Witzenhausen), der hauptsächlich lockeren Bestand von Wachholder (*Juniperus communis*) und dazwischen eine geschlossene Krautschicht ohne besonders typische Vertreter der Kalkflora trägt. Angaben über eine Nutzung des Geländes in früherer Zeit konnten nicht gefunden werden: in den letzten Jahren diente es nicht einmal als Schafweide.

Zum Vergleich diente eine im Hang liegende Blöße (also ohne jeden Pflanzenwuchs), der an den Hang anschließende Acker, ein Gartenboden des Göttinger Institutes und ein Hang an der Ratsburg nordöstl. von Göttingen, ebenfalls auf Muschelkalk, teils als sonniger Hang mit typischer Steppenflora, teils als Buchen-Hochwald ausgebildet. Die Humuszahlen (nach UNGERER³) und pH-Werte (in KCl), nach der Jahreszeit schwankend, waren:

	Humusgehalt	pH-Wert
Wachholderhang	3,6— 5,6	4,6—5,8
Acker	2,1— 3,0	4,6—5,8
Blöße	2,7— 3,0	4,8—5,8
Garten	3,3— 4,5	4,1—5,2
Ratsburg-Wald	13,7—18,5	4,4—5,4
Ratsburg-Steppe	5,8— 6,8	5,7—6,2

Die Untersuchungen erstreckten sich auf die Jahre 1944 und 1946; sie konnten 1945 leider nicht durchgeführt werden. Die Bodenproben wurden in 5 bis 10 cm Tiefe entnommen. Temperatur, Wassergehalt, Humusgehalt, Azidität der Böden wurden laufend gemessen. Die mikrobiologische Untersuchung erstreckte sich auf Keimzählungen durch Bouillon-Pepton-Agar für die „üblichen“ Keime, durch Spezialagar für *Actinomycetes*⁴, *Proactinomycetes*⁵ und *Pilze*⁶; ferner auf direkte Zählung nach CONN und WINOGRADSKY⁷ und die Auswertung von Bodenplatten nach ROSSI-CHOLODNY⁸. Von diesen Platten wurden auch die Direkt-Isolierungen vorgenommen. Ferner wurde die Bodenkammer- und die Bodenstaubmethode nach CHOLODNY verwendet.

Alle Präparate wurden mit Bengalrosa gefärbt oder mit Phenol-Erythrosin, das gegen die Humusteilchen etwas schärfer differenzierte, allerdings im Alter etwas verblaßte. „Fast acid blue“ ergab recht unklare Bilder und bei dichter Besetzung mit Mikroorganismen infolge der intensiven ins schwärzliche gehenden Farbe schlechte Differenzierung gegenüber den Humusteilchen. Die CHOLODNY-Platten wurden bis zu 4 Wochen im Boden belassen; sie wurden bei 5-10 cm Tiefe senkrecht eingegraben, weil dabei der Bewuchs besser war als bei waagerechtem Eingraben (z. B. 162 gegen 71 Organismen je Gesichtsfeld).

³ E. UNGERER: KLEIN'S Handbuch der Pflanzenanalyse. Bd. 4, S. 1196, Berlin, J. Springer, 1933.

⁴ Für *Actinomycetes* (nach CZAPK): 1000 aqua dest., 30 Zucker, 2 NaNO₃, 1 K₂HPO₄, 0,5 MgSO₄, 0,5 KCl, 0,01 FeSO₄, 15 Agar.

⁵ Für *Proactinomycetes*: 1000 aqua dest., 10 Glykose, 2 (NH₄)₂HPO₄, 1 K₂HPO₄, 0,5 MgSO₄, 0,5 NaCl, 15 Agar.

⁶ Für *Pilze*: 1000 aqua dest., 20 Glykose, 1 KH₂PO₄, 2 Asparagin, 0,5 MgSO₄, 0,5 NaCl, 0,5 FeCl₃, 25 Agar (pH 3,8—4,0) [nach H. L. JENSEN: Soil Sc. 31, 123, (1931)].

⁷ H. J. CONN: N. J. Agr. Exp. Stat. Geneva. Techn. Bull. 64 (1918); J. Bacteriology 17, 399 (1929). S. WINOGRADSKY, l. c.

⁸ G. ROSSI: Festschrift J. STOKLASA. P. Parey, Berlin 1928; D. CHOLODNY: Arch. f. Mikrobiologie 1, 620 (1930).

Der jahreszeitliche Verlauf der Gesamt-Mikroflora.

Abb. 1 gibt die Kurven des jahreszeitlichen Verlaufes der Gesamt-Mikroflora für den Wachholderhang. Die Werte mit der KOCH'schen Plattenmethode zeigen das bekannte Bild des Haupt-Maximums im Frühjahr, Abstieg im Sommer, eines zweiten, kleineren Maximums im Herbst, dem das tiefe winterliche Minimum folgt. Daß dieser Kurvenverlauf den tatsächlichen Verhältnissen im Boden entspricht, zeigt die weitere Kurve der Abb. 1; sie wurde aus Zählungen an CHOLODNY-

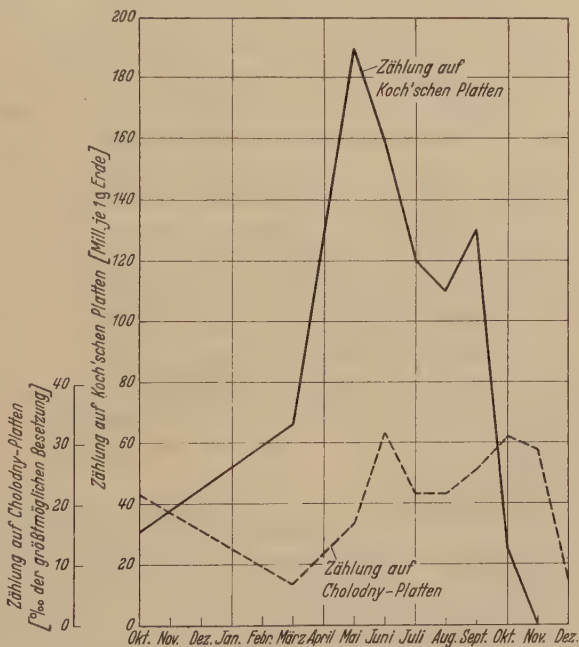


Abb. 1. Jahreszeitlicher Verlauf der Mikroorganismenzahl im Boden des Wachholderhangs (1944).

Platten gewonnen, wobei es sich allerdings nicht um absolute, sondern um relative Werte handelt, gewonnen in ‰ der maximalen Besetzung. Daß die Maxima der CHOLODNY-Kurve gegenüber den KOCH'schen Werten etwas nach rechts verschoben sind, liegt natürlich daran, daß die Untersuchung der CHOLODNY-Platten den etwas späteren Zeitpunkt des Bewachsens der Platten angeben muß.

Die übrigen Böden ergaben grundsätzlich das gleiche Bild, mit Ausnahme des Ratsburg-Waldes, der eine Kurve mit nur einem sommerlichen Maximum zeigte. Das stimmt mit der Angabe von FEHÉR⁹ überein. Jedoch ist, entgegen seiner Meinung, die Eingipfligkeit kein

⁹ D. FEHÉR: Untersuchungen über die Mikrobiologie des Waldbodens. J. Springer, Berlin 1933.

Charakteristikum für alle unbearbeiteten Böden, wie der Wachholderhang zeigt, sondern erscheint offenbar nur als Ergebnis bestimmter gleichmäßiger Verhältnisse, die eben im Falle des Wachholderhangs nicht so liegen wie im Waldboden, sondern wie im Acker- oder Gartenboden.

FEHÉR¹⁰ gibt ferner an, daß die Mikroorganismenentwicklung dem Produkt aus Temperatur \times Feuchtigkeit parallel gehe. Auch diese An-

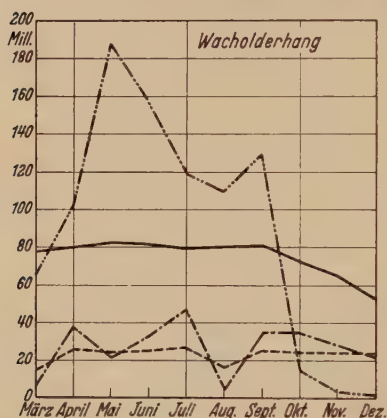


Abb. 2. Jahreszeitlicher Verlauf der Mikroorganismenzahlen und R-Werte (Produkt aus Bodentemperatur und Feuchtigkeit) im Boden des Wachholderhangs.

— · — · — Keimzahl in Millionen je 1g.
 — — — — — Logarithmus der Keimzahl
 - - - - - R-Werte absolut
 ········· R-Werte in Logarithmen.

nur keine Verminderung, sondern sogar eine Erhöhung der Mikroorganismenzahl bewirken könne, seien — obwohl solche Beobachtungen mit großer Wahrscheinlichkeit auf die Auflösung von Kolonien zurückgeführt werden konnten¹¹ — noch folgende Zahlen einer direkten Zählung nach CONN angeführt (Tab. I):

Tabelle I. Gesamtzahl der Mikroorganismen.

Boden	Monat	1. nach CONN (in Millionen je 1 g)	2. nach KOCH	Verhältnis 1) : 2)
Wachholderhang	September	590	125	etwa 5 : 1
	November	242	1,5	200 : 1
Blöße	September	145	15	10 : 1
	November	37	0,4	100 : 1
Garten	September	630	80	8 : 1
	November	458	2,5	200 : 1

¹⁰ D. FEHÉR u. M. FRANK: Arch. f. Mikrobiologie 8, 249 (1937); 9, 193 (1938).

¹¹ Literatur bei A. RIPPEL u. BLANCK's Handbuch der Bodenlehre. Ergänzungsband, J. Springer, Berlin 1939.

Darin zeigt sich also die schnelle Abnahme der Zahl der Mikroorganismen bereits vom September ab. Daß diese Abnahme bei der Zählung nach Koch unverhältnismäßig viel höher ist als bei der Conn-Zählung dürfte seine Ursache vielleicht darin haben, daß bei dieser zahlreiche bereits abgestorbene oder doch nicht mehr voll lebensfähige Keime erfaßt wurden.

Den Einfluß der übrigen Faktoren zeigt Abb. 3, ebenfalls für den Wachholderhang. Deutlich erweist sich die Abnahme der Azidität mit

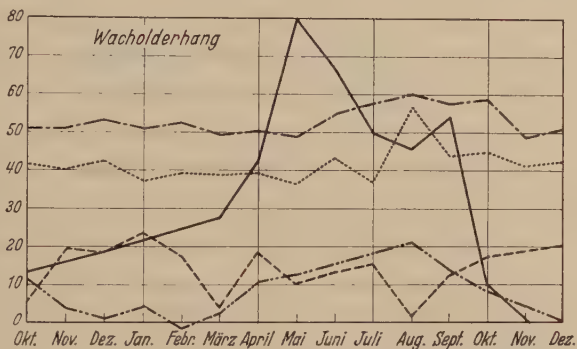


Abb. 3. Jahreszeitlicher Verlauf der Mikroorganismenzahlen und Bodenfaktoren im Boden des Wachholderhangs.

- Keimzahl in % (240 Millionen je 1 g = 100)
- Bodentemperatur in °C
- Wassergehalt des Bodens in %
- · - · - Bodenazidität (10-fach vergrößert)
- Humusgehalt des Bodens in % (10-fach vergrößert).

sinkender Mikroorganismenzahl und umgekehrt, was auch bei den übrigen, hier nicht angeführten Kalkböden (Acker, Ratsburg) der Fall war und was den Beobachtungen von FEHÉR (l. c.) entspricht. Auch der „Humusgehalt“ zeigt eine gewisse Abhängigkeit von der Mikroorganismenentwicklung: Unverkennbar ist die Zunahme an Humus im August bei gleichzeitiger Verminderung der Mikroorganismen, deren Entwicklung wiederum, wie man sieht, durch die abnehmende Feuchtigkeit gehemmt wird; auch diese Erscheinungen zeigten sich in den anderen untersuchten Fällen. Solche Untersuchungen haben natürlich nur vorläufig orientierenden Charakter, da der Begriff „Humus“, seine Angriffsfähigkeit durch Mikroorganismen usw. noch reichlich unbestimmte Dinge sind.

Die qualitative Zusammensetzung der Mikroflora.

In der qualitativen Zusammensetzung der Mikroflora zeigte sich zunächst ein relativ stärkeres Hervortreten der Pilze gegenüber den *Actinomycetales* (einschl. *Proactinomycetes* und *Mycobakterien*) in Kulturböden, namentlich Gartenboden, gegenüber den Naturböden (mit Ausnahme von eigentlichem Waldboden), wie die folgende Übersicht (Tab. II) zeigt.

Tabelle II. Zahl der Mikroorganismen in Millionen je 1 g Boden (Koch-Platten).

Boden	August bis September			November bis Dezember		
	Pilze	Actinomy- cetales (Pro- actinomyc.)	Verhältnis Pilze: Act. (bezw. Proa.)	Pilze	Actinomy- cetales (Pro- actinomyc.)	Verhältnis Pilze: Act. (bezw. Proa.)
Wachholderhang	20,5	51,5 (24,0)	0,40 (0,85)	1,75	2,55 (1,40)	0,70 (1,25)
Blöße	1,35	5,4 (1,65)	0,25 (0,82)	0,125	0,325 (0,150)	0,39 (0,83)
Acker	27,5	30,0 (21,0)	0,92 (1,30)	1,35	5,475 (2,85)	0,25 (0,47)
Garten	41,0	16,5 (6,5)	2,5 (6,3)	2,0	2,5 (0,50)	0,80 (4,0)

Verhältnis Pilze/Actinomycetales bei

	Cholodny-Platten	Isolierungen von Cholodny-Platten	Isolierungen *) von Koch'schen Platten
Wachholderhang	0,67 (0,30)	0,082	0,440
Blöße	1,67 (0,90)	0,120	
Acker	1,27 (0,94)	0,032	0,092
Garten	2,0 (1,21)	1,33	1,0
Ratsburg — Steppe			0,125
Ratsburg — Wald			0,750

Verhältnis Pilze/Actinomycetales (weitere Zählung auf Koch-Platten Mai 1944)

Bergwiese	0,48		
Wachholderhang	0,78	Fichtenwald	2,9
Buchenwald	1,8	Viehweide	3,2
Garten	2,1	Kiefernwald	3,9

*) andere Zählung wie oben; vergl. unten Tab. VIII.

In Wald- und Kulturböden ist somit das Verhältnis der Pilze/Actinomycetales größer als 1, in unbewaldeten Naturböden kleiner als 1. Diese Angaben gelten indessen nur für die Hauptvegetationsperiode. Nach dem Winter zu nehmen, wie die in der Übersicht für August/September bzw. November/Dezember mitgeteilten Zahlen zeigen, die Pilze offenbar weniger intensiv ab als die Actinomycetales, so daß auch der Wert von Gartenboden unter 1 sinkt, während der Wert für den Wachholderhang etwas gestiegen ist. Die in () hinzugesetzten Werte für die Proactinomycetes zeigen, daß diese sich in ungefähr gleichem Verhältnis ändern wie die eigentlichen Actinomycetales.

Die Übersicht zeigt ferner Werte für das gleiche Verhältnis, wie es durch Untersuchung von CHOLODNY-Platten gewonnen wurde, weiterhin bei Auswertung der Isolierungen von CHOLODNY-Platten (siehe unten) sowie bei Isolierungen mit Hilfe von weiteren KOCH'schen Platten. Sie alle führen zum selben Ergebnis: Stärkerer Pilzanteil bei Gartenboden im Vergleich zum Wachholderhang. Endlich zeigt ein

Vergleich noch weiterer Böden (zu unterst in der Übersicht) wiederum dasselbe: Wachholderhang und Bergwiese heben sich Kultur- und Waldböden gegenüber durch einen geringeren Pilzanteil im Vergleich zu den *Actinomycetales* hervor. Diese Erscheinung kann somit als genügend sicher erwiesen gelten.

Wesentlicher erscheint noch, daß sich auch in dem Verhältnis der *Bakterien* zu den *Actinomycetales* eine Verschiebung zeigt, die aus der nachfolgenden Übersicht (Tab. III) zu entnehmen ist. *Actinomycetales* (einschl. *Proactinomycetes* und *Mycobakterien*) treten also im Naturboden sehr viel stärker in Erscheinung als im Kulturboden (Wachholderhang gegen Gartenboden). Außerdem verschiebt sich das Ver-

Tabelle III a. Zahl der Mikroorganismen in Millionen je 1 g Boden auf KOCH-Platten.

Boden	August — September			November — Dezember		
	Bakterien	Actinomycetales (Proactinomycetes)	Actin. in % der Bakt.	Bakterien	Actinomycetales	Actin. in % der Bakt.
Wachholderhang	120	51,5 (24,0)	42,9 (20,0)	1,60	2,55 (1,40)	160 (90)
Blöße	14,75	5,4 (1,65)	30,6 (11,2)	0,225	0,325 (0,15)	144 (67)
Acker	135	30,0 (21,0)	22,2 (15,6)	1,45	5,48 (2,85)	378 (197)
Garten	115	16,5 (6,5)	14,4 (5,7)	2,5	2,5 (0,50)	100 (20)

Tabelle III b. Prozentualer Anteil der Mikroflora bei direkter Isolierung von ROSSI-CHOLODNY-Platten.

	Actinomycetales	Bakterien ohne Azotobacter	Azotobacter	Actinomycetales auf 100 Bakterien
Wachholderhang	42,5	36,2	0	118
Blöße	19,8	78,1	0	25
Acker	46,9	45,5	4,5	94
Garten	12,6	49,3	8,4	22

hältnis zum Winter dergestalt, daß die *Actinomycetales* noch weitaus stärker hervortreten und nunmehr auch im Gartenboden fast an die Werte des Wachholderhangs herankommen. Das bedeutet mit anderen Worten, daß in dieser Hinsicht der Kulturboden gegen den Winter hin die Eigenschaft eines Naturbodens annimmt. Da sich aus noch nicht veröffentlichten Untersuchungen von E. KÜSTER ergeben hatte, daß gerade *Proactinomycetes* befähigt sind, Humusstoffe anzugreifen, die für „gewöhnliche“ Mikroorganismen nicht verwertbar sind, so dürfte in dem Verbleiben der resistenten organischen Stoffe im Boden nach dem Verbrauch der leicht abbaubaren eine der Hauptursachen für das gegen den Winter zunehmende Hervortreten der *Actinomycetales* (einschl. der *Proactinomycetes*) sowie deren Vorherrschen auf Naturboden zu suchen

sein. Es sei noch darauf aufmerksam gemacht, daß die Blöße im Wachholderhang bei sehr geringer Mikroorganismenzahl in dem Verhältniss der *Proactinomycetales* zu den *Bakterien* dem Ackerboden entspricht. Wie der untere Teil der obigen Übersicht zeigt, ergibt sich aus den Zahlen der direkten Isolierungen von CHOLODNY-Platten genau dasselbe gleiche Bild wie bei Untersuchungen durch KOCH'sche Platten.

Wir können nach den geschilderten Ergebnissen annehmen, daß die *Actinomycetales*, namentlich auch die *Proactinomycetes*¹², einen wesentlichen Bestandteil der autochthonen Mikroflora des Bodens bilden dürften; daß dieser Gruppe eine weit größere Bedeutung zukommen könnte als vorher bekannt war, geht insbesondere für die *Proactinomyceten* schon aus den Untersuchungen von JENSEN hervor. Ihre Zerfallsformen, namentlich die kokkoiden Formen, dürften bei mikroskopischer Untersuchung von Böden vielfach für Bakterien gehalten worden sein (vergl. hierzu auch die weiter unten folgenden Ausführungen über die Direktisolierungen).

Es darf jedoch nicht verschwiegen werden, daß solche Untersuchungen erheblichen Schwankungen unterliegen können. Die oben angeführten beziehen sich auf das Jahr 1944. Versuche des Jahres 1946 zeigten ein erheblich stärkeres Zurücktretten der *Actinomycetales*. Zum Teil lag das an der zeitbedingten Verwendung von Probacit anstatt Bouillon-Pepton-Agar, zum andern Teil aber dürften die 1946 im Vergleich zu 1944 höheren Feuchtigkeitsverhältnisse sowie sicherlich auch noch sonstige nicht ohne weiteres kontrollierbare Faktoren die Ursache sein. Hinsichtlich solcher Ergebnisse sei auf die ausführliche eingangs zitierte Arbeit von M. HOPF verwiesen.

Weiterhin interessierte noch das Verhältnis der einzelnen Bakterienformen zueinander. Einwandfrei ergab sich (Tab. IV) bei CHOLODNY-Platten sowie bei der mikroskopischen Untersuchung nach CONN und WINOGRADSKY, daß im Naturboden (Wachholderhang und Ratsburg-

Tabelle IV. Prozentualer Anteil der Bakterien-Formen.

	Kokken	Kokken $\frac{1}{2}$	Stäbchen	Verhältnis Kokken $\frac{1}{2}$: Stäbchen
Wachholderhang	43	21,5	22,5	0,95
Blöße	25	12,5	35	0,36
Acker	14,4	7,2	23	0,31
Garten	21	10,5	31	0,34
Ratsburg — Steppe				1,50

Zahlen von CHOLODNY-Platten

Steppe) Kokken stärker hervortreten als Stäbchen, während es im Kulturboden (Garten) umgekehrt ist. Die Blöße entspricht wiederum dem

¹² H. L. JENSEN: Proc. Linn. Soc. N. S. Wales **55**, 231 (1930); **56**, 345 (1931); **57**, 364 (1932); **58**, 181 (1933); **59**, 19, 101 (1934). O. v. PLOTHO: Arch. f. Mikrobiologie **14**, 12, 142 (1948). Ferner: R. BOKOR: In D. FEHER, Mikrobiologie des Waldbodens, J. Springer, Berlin 1933; L. M. SNOW: Soil Sc. **39**, 233 (1935).

Acker. Es muß dabei beachtet werden, daß sich unter „Kokken“ sehr viele *Actinomycetales*, namentlich *Proactinomycetes*, befinden. In der obigen Übersicht sind daher zur Berechnung des Verhältnisses Kokken/Stäbchen die Kokken, natürlich ziemlich willkürlich, = $\frac{1}{2}$ der gezählten Kokken angenommen.

Die Untersuchung der verschiedenen Spezialtypen ergab folgenden Unterschied zwischen Gartenboden und Wachholderhang. *Azotobacter*

Es waren mehr vorhanden:

Im Gartenboden	Im Wachholderhang
<i>Zellulosezer-setzer</i> (10—100-fach)	<i>Proactinomycetes</i> (10-fach)
<i>Denitrifikanten</i> (1—10-fach)	<i>Mycobakterien</i> (100-fach)
<i>Asparaginzer-setzer</i> im Frühjahr	<i>Actinomycetes</i> (10-fach)
(100-fach)	<i>Eiweißzer-setzer</i> (10-fach)
<i>Aspergillus niger</i> (im Wachholderhang seltener)	<i>Asparaginzer-setzer</i> im Herbst (10-fach)
<i>Azotobacter</i> (fehlt im Wachholderhang)	
Gesamt-Mikroorganismen (10-fach)	

Annähernd gleich waren *Harnstoffzer-setzer*, *Nitrit-* und *Nitratbildner*.

erwies sich also wiederum als Kulturform¹³. Im übrigen wechseln, wie man sieht, die Werte bisweilen mit der Jahreszeit: die *Asparaginzer-setzer* sind im Frühjahr weit häufiger im Gartenboden, im Herbst im Wachholderhang. Auffallend ist die starke Überlegenheit des Gartenbodens an *Zellulosezer-setzern*, während *Nitrifikanten* annähernd gleich häufig in dem Gartenboden und in dem Boden des Wachholderhanges sind. Das könnte für die *Nitrifikanten* auffallend erscheinen, man muß jedoch berücksichtigen, daß ihre Zahl überhaupt sehr gering ist (10000 bis 100000) gegenüber den *Zellulosezer-setzern* (im Gartenboden 1 bis 10 Millionen). Daraus geht hervor, daß z. B. in Hinsicht auf die Nitrifikation ein Naturboden, sofern er überhaupt dafür geeignet ist, nicht von einem Kulturboden zu unterscheiden ist. Oder mit anderen Worten: Die Charakterisierung eines Naturbodens kann im jeweiligen Fall nur immer hinsichtlich einzelner Mikroorganismen-Gruppen erfolgen, je nach dem chemisch-physikalischen Zustand des Bodens¹⁴. Bevor man alle Naturböden mikrobiologisch genauer beschreiben kann, müßten also noch sehr viele Einzeluntersuchungen durchgeführt werden. Daß auch bei den eben erwähnten Versuchen die Überlegenheit des Wachholderhanges hinsichtlich der *Actinomycetales* hervortritt, mag noch kurz erwähnt sein.

Es wurde noch versucht, einige weitere Unterschiede zwischen den Böden aufzufinden. Erhöhung der Nährsalzkonzentration auf 120 bzw. 150 ‰ förderte

¹³ H. WENZL: Beih. Botan. Cbl. I, 52, 73 (1934); Cbl. Bakt. II, 89, 353 (1934); W. KRAUSE: Planta 31, 91 (1940); W. FISCHER: Arch. f. Mikrobiologie 14, 353 (1949).

¹⁴ Beispielsweise ist bekannt, daß im Hochmoorboden *Zellulosezer-setzer* fehlen (ebenso natürlich *Nitrifikanten*). Hier haben wir aber bereits einen sehr extremen Bodentyp, verglichen mit einem Kulturboden. Vgl. die eingangs gemachte Bemerkung (im 2. Absatz).

auf dem Wachholderhang die Entwicklung der *Actinomycetales*, *Zellulosezersetzer* und von *Aspergillus*, während im Ackerboden alle Gruppen bei normaler Konzentration am besten gediehen. — In sauerstoffarmer Atmosphäre entwickelten sich aus Wachholderboden mehr Keime (60,7 %) als aus Ackerboden (39,3 % der so erhaltenen Mikroorganismen). — Im Wachholderhang und Ackerboden traten zu 76 % Mikroorganismen mit „festen“ Kolonien auf, während im Gartenboden 50 % weiche, zerfließliche Kolonien bildeten (vgl. OKADA¹⁵). Bis zu einem gewissen Grade entspricht das den Anschauungen von G. ROSSI und von WINOGRADSKY (l. c.) über das Vorherrschen „fester“ Kolonien in Ackerböden, wenn auch nach den verschiedensten Methoden im Wachholderhang einzeln liegende oder in sehr lockeren Verbänden vorkommende Kolonien, namentlich von Stäbchen, gefunden wurden.

Sehr eigenartig erschien der hohe Gehalt von *Hefen*, wie er insbesondere aus den später zu beschreibenden Isolierungen von CHOLODNY-Platten im Wachholderhang festgestellt wurde: 17,6 % der so aufgefundenen Mikroflora! Zweifellos dürften hier Ameisen als Verbreiter in Frage kommen, wie z. B. auch die *Fettheife* (*Candida Reukaufii*) von einer Petrischale isoliert worden war, über die eine Ameise gekrabbelt war. Der Beweis dafür konnte durch Untersuchung von Erdkrümelchen eines Ameisenloches im Wachholderhang erbracht werden, wobei sich 35 bis 40 % der aufgefundenen Mikroorganismen als *Hefen* erwiesen. Wir haben hier also ein schönes Beispiel für den Zusammenhang zwischen Mikroorganismen-Vorkommen und Insekten.

Als weitere Besonderheit sei erwähnt, daß einmal, und zwar bei Isolierungen von CHOLODNY-Platten, ein *Spirillum* aufgefunden wurde, und zwar im Ackerboden, auf den es vermutlich durch Dünger gelangt war. Es konnte allerdings nicht dauernd weiter kultiviert werden.

Unmittelbare Isolierungen von CHOLODNY-Platten.

Ein wesentlicher Teil der Untersuchungen war, zu versuchen, unmittelbar im Boden gesehene Mikroorganismen als Einzell-Kulturen zu isolieren, weiter zu kultivieren und zu bestimmen. Die Isolierungen wurden mit Hilfe des Mikromanipulators ausgeführt. Da die Isolierung aus dem Boden selbst nicht möglich erschien, wurde sie von Objektträgern vorgenommen, die nach der ROSSI-CHOLODNY-Methode im Boden eingegraben waren. Es wurden dazu reine Objektträger verwendet, um möglichst an die natürlichen Verhältnisse heranzukommen, nicht also solche, die mit irgendwelchen Zusätzen versehen waren, die bestimmte Spezialisten hätten auswählen können. Natürlich blieben diese Platten ungefärbt.

Abgesehen von der Schwierigkeit des Erkennens selbst ist die Isolierung auch sonst nicht einfach. Die Objektträger sind zu trocken. Ein Benetzen mit sterilem Wasser empfiehlt sich nicht, da einmal Mikroorganismen abgeschwemmt werden und sich nicht mehr in der ursprünglichen charakteristischen Lagerung befinden, andererseits abgeschwemmte Erdpartikelchen die Kapillaren verstopfen können. Daher wurden die Objektträger vor dem Isolieren einige Stunden in eine feuchte Kammer gestellt. Auch dann aber ließen sich häufig einzelne Zellen nicht aus dem Verbands lösen. Eine

¹⁵ V. OKADA: Soil. Sc. **43**, 367 (1937).

weitere Schwierigkeit besteht darin, daß ja nur in Ausnahmefällen erkannt werden kann, um welchen Spezialisten es sich handelt, die zur Weiterkultivierung notwendige Nährlösung also nicht darauf eingestellt werden konnte. Möglich war es z. B. bei *Nitrifikanten* mit ihren charakteristischen, an Erdbartikeln sitzenden Kolonien und bei *Azotobacter*. Auch bei einigen *Zellulosezersetzern* gelang es, da sie auch auf gewöhnlichen Nährböden wachsen, nicht jedoch bei der *Cytophaga*-Gruppe. Diese Formen wurden jedoch überhaupt niemals in der von der Kultur bekannten Form gesehen. Woran das liegt, kann nicht gesagt werden. Entweder sehen sie im Boden etwas anders aus oder aber es erfolgt keine Ansiedlung auf den Objektträgern.

Ein wesentliches Hilfsmittel zur Beurteilung der CHOLODNY-Platten bildeten die Bodenkammer-¹⁶ und die Bodenstaubmethode¹⁷, beide nach CHOLODNY, über die an dieser Stelle noch etwas gesagt sei. Wie CHOLODNY selbst schon hervorhebt, kann man mit ihrer Hilfe die Sukzession der Mikroorganismen gut verfolgen, allerdings ohne unbedingte Gewähr dafür, daß diese in der Natur ebenso verläuft. Es bestätigte sich für die Bodenkammer-Methode, daß in den ersten 3 Tagen *Pilze* wuchsen, die gelegentlich fruktifizierten (*Penicillium*-, *Aspergillus*-Arten, *Phycomycetes*). Daneben stellten sich *Actinomycetes* ein mit typischen Luftspiralen und später *Bakterien*, die anfänglich nur am Rande von Erdbartikeln erschienen. Vom 5. Tage ab verschwanden *Actinomycetes*, *Proactinomycetes* und viele Stäbchen, d. h. sie zerfielen. Es beherrschen dann *Kokken*, *Doppelkokken*, *kokkoiden* oder *ellipsoiden Formen* das Feld, höchstens noch kurze oder zierliche Stäbchen, besonders in der Umgebung der z. T. in Zersetzung befindlichen Pilzhyphe. *Pilze* und auch *Actinomycetes* scheinen somit Pioniere der Mikroorganismenentwicklung zu sein. Das oben erwähnte stärkere Hervortreten der *Pilze* gegen den Winter hin dürfte bis zu einem gewissen Grade mit dieser Beobachtung übereinstimmen. — Die Bodenstaubmethode nach CHOLODNY zeigte größte Ähnlichkeit mit den Bodenplatten nach CHOLODNY.

Als erstes ergab sich bei den Isolierungsversuchen, daß die Organismen in der Kultur oft ganz anders aussehen als auf der CHOLODNY-Platte: *Kokken* erwiesen sich als *Proactinomycetes* oder *Mycobakterien*, Sporen keimten aus usw.¹⁸.

Endgültig wurden 216 Organismen auf diese Weise als Einzell-Kulturen herangezüchtet, die sich auf 50 verschiedene Arten verteilten. Die folgende Übersicht (Tab. V) gibt eine Aufstellung der isolierten Arten und der Fundstelle, wobei bemerkt sei, daß die Identifizierung in manchen Fällen nur annähernd durchgeführt werden konnte. Die weitere Übersicht (Tab. VI) zeigt an ausgewählten Beispielen, wie der Organismus im Augenblick der Isolierung aussah und wie er nachher in Kultur erschien. Endlich zeigt die letzte Übersicht (Tab. VII) die Zugehörigkeit zu den verschiedenen Hauptgruppen der Mikroorganismen.

Zu diesen Aufstellungen ist nichts weiter zu bemerken. Nur darauf sei noch hingewiesen, daß die Zusammensetzung der Mikroflora auf den verschiedenen Böden dem auch mit anderen Untersuchungsmethoden

¹⁶ D. CHOLODNY: Arch. f. Mikrobiologie 5, 148 (1934).

¹⁷ D. CHOLODNY: Arch. f. Mikrobiologie 7, 286 (1936).

¹⁸ Auch Bodenpilze können im Boden anders aussehen als in Kultur: W. KUBICNA: Arch. f. Mikrobiologie 3, 507 (1932).

Tabelle V. Die von CHOLODNY-Platten isolierten Mikroorganismen.

	Wachholder	Acker	Garten	Blöße
<i>Eubacteriales</i>				
1. <i>Nitrobacteriae</i>	1	6	2	1
2. <i>Pseudomonas denitrificans</i>	5		1	
3. „ <i>boreopolis</i>	1		1	
4. „ <i>fluorescens</i>			2	2
5. „ <i>striata</i>				1
6. <i>Vibrio agar liquefaciens</i>	2			
7. <i>Cellvibrio flavescens</i>				2
8. <i>Spirillum spec.</i>		1		
9. <i>Azotobacter chroococcum</i>		3	2	
10. <i>Micrococcus candicans</i>	1			
11. „ <i>candidus</i>	1			
12. „ <i>conglomeratus</i>		1		
13. „ <i>corallinus</i>	1	1		
14. „ <i>perflavus</i>	2			1
15. „ <i>roseus</i>	2	1		1
16. „ <i>sphaeroides</i>	3	3		
17. <i>Sarcina lutea</i>	1		1	
18. <i>Bacterium globiforme</i> *)	2	5	2	2
19. „ <i>parvulum</i>	1	1		3
20. <i>Flavobacterium diffusum</i>	1	1		1
21. <i>Achromobacter nitrificans</i>	1			3
22. <i>Cellulomonas flava</i>	1	2		1
23. „ <i>rossica</i>				2
24. <i>Bacillus brevis</i>				2
25. „ <i>fusiformis</i>	1	1		1
26. „ <i>megaterium</i>			1	
27. „ <i>mesentericus</i>		2		1
28. „ <i>mycoides</i>			2	1
29. „ <i>repens</i>	1	1		1
30. „ <i>nitroxus</i>				1
31. „ <i>simplex</i>	1			1
32. „ <i>sphaericus</i>		2		1
33. „ <i>subtilis</i>	2	2		3
Summe	31	33	14	32

*) Ich möchte annehmen, daß diese Form zu den *Actinomycetales* zu stellen sei. Allerdings entsteht die Kokkenform nicht durch einfachen Zerfall sondern ist von einer schwachen Kontraktion der Zellen begleitet. Weitere Untersuchungen über die Morphologie dieser „autochthonen“ Form, die bei mir einen Anteil von 2,5—8,3% der Mikroflora der Böden hatte, wären sehr erwünscht [vgl. H. J. CONN u. M. A. DARROW: Soil Sc. **39**, 95 (1935); G. BERGE: Manual of determinative Bacteriology 5. Aufl. Baillière, Tindall u. Cox, London 1939; L. E. TOPPING: Cbl. Bakt. II **97**, 289 (1937/38); **98**, 193 (1938). — Vgl. weiter: H. J. CONN und J. DIMNICK: J. Bacteriology. **54**, 291 (1947)].

Tabelle V. (Fortsetzung.)

	Wachholder	Acker	Garten	Blöße
Übertrag	31	33	14	32
<i>Actinomycetales</i>				
34. <i>Actinomycetes</i>	11	13	2	4
35. <i>Proactinomyces agrestis</i>	9	4		
36. „ <i>actinomorphus</i>	1			1
37. „ <i>coeliacus</i>	2	5		1
38. „ <i>globulus</i>		2	1	
39. „ <i>polychromogenes</i>	1	1		
40. „ <i>rubropertinctus</i>	4			
41. <i>Mycobacterium lacticola</i>	2	2		
42. „ <i>phlei</i>	3	4		2
43. <i>Chlamydobacterium</i>			1	
<i>Saccharomycetales</i>				
44. <i>Mycelhefe</i>	8		1	
45. <i>Sproßhefe</i>	7	1	1	
<i>Mycetes</i>				
46. <i>Hormodendron</i>	1			
47. <i>Rhizopus</i>	1			
48. <i>Aspergillus</i>	1		1	1
49. <i>Penicillium</i>		1	2	
50. <i>Mucor</i>			1	
Gesamtzahl	82	66	24	41

gewonnenen Bild entspricht, wie oben mehrfach ausgeführt wurde. Insbesondere sei aber noch darauf hingewiesen, daß diese CHOLODNY-Isolierungen ziemlich genau den Werten entsprechen, die sich aus weiteren Isolierungen von KOCH'schen Platten ergaben, die zum Vergleich vorgenommen wurden (s. Tab. VIII)¹⁹. Da diese Zählungen nicht sehr umfangreich sind, so ist die Übereinstimmung namentlich im Gegensatz Wachholderhang zu Gartenboden, recht überzeugend, vor allem, wenn man die so verschiedenartigen Isolierungsmittel beachtet. Jedenfalls können die KOCH'schen Platten, was etwas überrascht, ein einigermaßen befriedigendes Bild dieser Verteilung ergeben, vorausgesetzt natürlich, daß die für die jeweiligen Gruppen geeigneten Spezialnährböden verwendet werden.

¹⁹ Es handelt sich um den in Tab. II, Mitte rechts schon kurz angeführten Vermerk.

Tabelle VI. *Charakteristika einiger Isolierungen auf CHOLODNY-Platten und in Kultur.*

Bakterienart	Bei der Isolierung verwendeter Nährboden	Aussehen der Kolonien	
		beim Isolieren*)	in Reinkultur
1. <i>Nitrobacteriae</i>	NO ₂ - und NH ₄ -Agar	Stäbchen an Humus; Einzelstäbchen; kleine Kurzstäbchenkolonie in lebhafter Bewegung; große Stäbchenkolonie mit Langettenrand	durchsichtig farblose bis gelbliche, flächige oder kleine Kolonien
2. <i>Pseudomonas</i>	NO ₃ -Agar	Stäbchenhaut; schlanke Doppelstäbchen; lockere Kolonie, Stromstäbchen	weiße bis rötliche, aufliegende Fläche, z. T. keine scharfen Ränder
3. <i>Vibrio</i>	Bouillon-Pepton- und NO ₃ -Agar	Krummstäbchenkolonie mit gefranstem Rand; plumpe Stäbchen an Humus	farblos bis gelbbraun, Rand uneinheitlich
4. <i>Azotobacter</i>	Mannit	Schleimhofkolonie	glänzende, farblose, später dunkle Kolonien in Schleimhülle
5. <i>Micrococcus candidans</i>	Bouillon-Pepton-Agar	Kokken in lockerem Verband	üppige, weißglänzende Hügel
<i>candidus</i>	Kokken im „freien“ Raum	glänzend weiße Fläche
<i>conglomeratus</i>	Kokkenklumpen	gelbliche Hügel, flachere, durchsichtige Randzone
<i>corallinus</i>	winzige Kokken in Häufchen	rote Punkte
<i>perflavus</i>	kleine Doppelkokken in gelappter Kolonie	lebhaft gelbe Fläche mit lappig gewelltem Saum
<i>roseus</i>	Kokkenstäbchen	leuchtend rote, starke Kolonie
<i>sphaeroides</i>	Stäbchen aus Doppelkokken	weißliche Klumpen; Randzone durchsichtig

*) Beim Isolieren konnte keine Eigenfarbe festgestellt werden.

Tabelle VI. (Fortsetzung.)

Bakterienart	Bei der Isolierung verwendeter Nährboden	Aussehen der Kolonien	
		beim Isolieren	in Reinkultur
6. <i>Sarcina</i>	Bouillon-Pepton-Agar	Kokkenanhäufung, Tetraden	gelb, Rand z. T. aufgelockert
7. <i>Bacterium globiforme parvulum</i>	Bouillon-Pepton- und NO_3 -Agar	kleine Kokkoide, Mitte lockerer; Kurzstäbchen; Stäbchenkolonie, Rand lockerer	farblos durchsichtige Punkte
8. <i>Flavobacterium</i>	Bouillon-Pepton-Agar	kleine Stäbchen zu 1—4 zusammen an Erde	gelbe, weiche Decke
9. <i>Achromobacter</i>	„ „	schlanke Stäbchen in lockerem Feld	kleine schmutzig-weiße Kolonien, Rand unscharf
10. <i>Cellulomonas</i>	Bouillon-Pepton- und NO_3 -Agar	schlanke Stäbchen an Humus; dichte Stäbchenkolonie	üppig zitronengelb
11. <i>Bacillus brevis fusiformis subtilis</i>	Bouillon-Pepton-Agar	Zerströmtes Stäbchenfeld; Doppelstäbchen an Pilzfaden; durchsichtiger Schleier an Aktinomyzet; Feld langer Sporenstäbchen	Schmutzig weiße, feucht glänzende, oft viskose Schicht, Rand zerfranst, behaart
<i>megaterium</i>	„ „	Stäbchenfeld an Humus-Stäbchen mit Inhaltskörpern	creme, schmierige Schleimschicht, Rand zerfahren
<i>mesentericus</i>	„ „	grobe, regellose Stäbchen mit Struktur	weiche Cremeschicht, Rand gelappt, lockig
<i>mycoides</i>	„ „	Stäbchenkette als Sporen; Stäbchenfeld	schmutzige Schleimschicht, Rand lockig verästelt
<i>nitroxus</i>	„ „	große „Kokken“-sporen	gelbliche, scharf begrenzte Kolonie
<i>repens, simplex</i>	„ „	beulenartiges Feld von zugespitzten Stäbchen; große ellipsoide-Sporen	farblos durchsichtige z. T. körnige Kolonien

Tabelle VI. (Fortsetzung.)

Bakterienart	Bei der Isolierung verwendeter Nährboden	Aussehen der Kolonien	
		beim Isolieren	in Reinkultur
11. <i>Bacillus sphaericus</i>	Bouillon-Pepton- Agar	Lichtbrechende große Doppel- sporen; einzelne Stäbchen mit Hof	gelblich-braune Fläche
12. <i>Actinomycetes</i>	Bouillon-Pepton- Agar und Krainsky- Agar	Sporen; Faden- bruchstücke; rechtwinklig ver- zweigte Myzelien	Hügel, Hexen- ringe, körniger Belag, Büschel, kalkweiß, rosa, rot, grau, grün- lich, bräunlich, Ränderverzweigt, Medium oft mit- gefärbt
13. <i>Proactino- mycetes</i>	Waksman- Jensen- und Bouillon-Pepton- Agar	Kurzstäbchen; Krummstäbchen in lockerem Ver- band; Stäbchen- myzel, Kokkoide, hautartige Kurz- stäbchenkolonie; Winkelstäbchen	durchsichtig farb- los bis rot und braune Polster, Rand oft verästelt
14. <i>Mycobacteriae</i>	Söhngen- und Bouillon-Pepton	Kokken myzel- artig aneinander- gereiht; Kurz- stäbchenfäden, auseinander- brechend; Stäb- chen; Kokkoide	gelb bis orange Punkt- und Flächenkolonien Rand z. T. fädig, sonst scharf

Tabelle VII. Verteilung der CHOLODNY-Isolierungen auf die verschiedenen Mikroorganismengruppen.

	Wachholder	Blöße	Acker	Garten
<i>Nitrifikanten</i>	1,1	2,4	9,1	8,4
<i>Pseudomonadaceae</i>	9,4	12,2	1,5	16,8
<i>Azotobacter</i>	0	0	4,5	8,4
<i>Coccaceae</i>	13,0	4,9	9,1	4,2
<i>Bacteriaceae</i>	7,0	29,3	13,7	8,4
<i>Bacillaceae</i>	5,7	29,3	12,1	11,5
<i>Actinomycetes</i>	13,1	10,0	19,7	8,4
<i>Proactinomycetes</i>	20,0	4,9	18,1	4,2
<i>Mycobacteriaceae</i>	9,4	4,9	9,1	0
<i>Chlamydobacteriaceae</i>	0	0	0	4,2
<i>Saccharomycetes</i>	17,6	0	1,5	8,4
<i>Mycetes (ohne Hefen)</i>	3,5	2,4	1,5	16,8

Tabelle VIII. *Prozentuale Verteilung der Mikroorganismengruppen bei CHOLODNY- (bzw. KOCH-) Isolierungen.*

Boden	Bakterien	Actinomycetales	Pilze ohne Hefen
Wachholderhang	36,2 (42,2)	42,5 (27,3)	3,5 (12,0)
Blöße	78,1 (58,9)	19,8 (20,5)	
Acker	50,0 (57,1)	46,9 (39,3)	1,5 (3,6)
Garten	57,7 (45,5)	16,8 (27,3)	16,8 (27,2)

Zusammenfassung.

Die Untersuchung eines Naturbodens (Wachholderhang) im Vergleich zu Kulturböden (Garten, Acker) mit den verschiedensten Methoden ergab ein kleineres Verhältnis *Pilze/Actinomycetales* für den Naturboden und ein starkes Hervortreten der *Actinomycetales* und *Kokken* gegenüber den *Bakterien* bzw. *Stäbchen*. Gegen den Winter zu nimmt der Kulturboden im zunehmenden Anteil der *Actinomycetales* die Eigenschaften eines Naturbodens an.

Es wurden 216 Einzell-Isolierungen direkt von CHOLODNY-Platten vorgenommen, die sich auf 50 verschiedene Arten verteilten. Somit ist zum ersten Male die unmittelbare Isolierung von Mikroorganismen aus Boden geglückt. Das Aussehen der isolierten Mikroorganismen weicht u. U. erheblich vom Aussehen in der Kultur ab.

Azotobacter fehlt dem Naturboden. *Hefen* sind u. U. sehr zahlreich, was auf einen Zusammenhang mit Ameisen zurückgeführt werden konnte.

Bezüglich weiterer Einzelheiten sei auf die ausführliche Dissertation verwiesen.

(Aus dem Botanisch-Mikrobiologischen Institut der Technischen Hochschule Karlsruhe.)

Beiträge zur Biologie und Entwicklungsgeschichte der *Myxobakterien*.

Von

H. KÜHLWEIN.

Mit 10 Textabbildungen.

(Eingegangen am 20. August 1948.)

Die *Myxobakterien* nehmen im System der Bakterien eine untergeordnete Stellung ein. Schon ERWIN BAUR, dem wir aus dem Jahr 1904 eine kleine Studie über diese Organismen verdanken, wies darauf hin, daß die ganze Gruppe meist völlig mit Stillschweigen übergangen oder als Organismen von sehr zweifelhafter Stellung erwähnt werden. Zwar ist inzwischen durch JAHN (1924) die Gültigkeit dieser Feststellung BAURS abgeschwächt, doch keineswegs aufgehoben worden. JAHNS Monographie der *Polyangiden* erstrebte nur eine Vollständigkeit in systematischer Hinsicht, so daß auch heute nach weiteren 20 Jahren unsere Kenntnisse über die Biologie der *Myxobakterien* recht lückenhaft sind.

Die ersten sicheren Angaben über *Myxobakterien* stammen von THAXTER, der ihnen auch den Namen gab. Er beschrieb eine Reihe von in Amerika vorkommenden Arten und erkannte auch bereits, daß es sich um Organismen mit *Schizomycetennatur* handelt. Den aus der Zeit um 1897 stammenden Arbeiten THAXTERS folgten dann auch in Deutschland einige wenige, die sich mit dem Vorkommen, der systematischen Stellung und der Entwicklungsgeschichte derselben beschäftigten. Unter ihnen haben uns eigentlich nur E. BAUR (1904), KOFLER (1913) und JAHN (1924/1936) eingehende Beobachtungen vermittelt. Im einzelnen hat JAHN in der erwähnten *Polyangidenmonographie* sich schon sehr kritisch mit dem vorhandenen Schrifttum auseinandergesetzt, so daß wir uns hier mit diesem Hinweis begnügen können.

Auf Grund des derzeitigen Standes unserer Kenntnisse über die *Myxobakterien* sind wir zwar in der Lage, den Entwicklungsablauf in großen Zügen zu übersehen, über ihre Bedeutung im Stoffkreislauf sind wir aber nicht annähernd so gut unterrichtet. Unsere Untersuchungen dienten dazu, die Biologie der *Myxobakterien*, vor allem die ernährungsphysiologischen Grundlagen derselben, näher kennen zu lernen. Dabei drängten sich naturgemäß auch Fragen ökologischer, systematischer und entwicklungsgeschichtlicher Art auf. Soweit sie bearbeitet sind, wurde vergleichsweise auch auf frühere Ergebnisse eingegangen und diese mußten einer Kritik unterzogen werden. Wenn die Arbeit schon jetzt zum Abschluß gelangt, so soll damit kein Anspruch auf Vollständigkeit erhoben werden. Eine Reihe von Problemen, die im

Verläufe der Untersuchungen auftauchten, konnten nur andeutungsweise erwähnt werden.

1. Vorkommen und Systematik.

a) Vorkommen.

Die *Myxobakterien* sind wohl in der überwiegenden Mehrzahl dadurch bekannt geworden, daß sie im Gegensatz zu allen anderen Bakterien sehr auffallende Fruchtkörper bilden. Die Auffindung der Fruchtkörper genügt aber nicht zur Entscheidung der Frage, wo in der Natur die primäre Entwicklung vorzugsweise stattfindet. LIESKE (1926) hat diese Frage schon aufgeworfen, und wir müssen sie heute aufs neue stellen. Die Literatur über *Myxobakterien* berichtet ziemlich übereinstimmend von den Fundorten. Als solche werden vor allem genannt der Mist von Pflanzenfressern, seltener auch faule Blätter, verrottete Zweige, Flechten und Rinden. Nur einmal findet sich die Angabe (KOFLEK 1913), daß auch auf Mist von Feldmäusen sehr reichlich *Myxobakterien* vorkommen. „Frischer Mist liefert dagegen, wie man leicht feststellen kann, keine *Myxobakterien*. Daraus folgt, daß die Keime nachträglich durch den Wind oder vom Boden her auf das Substrat gelangen“ (JAHN 1936).

Ausgehend von der Vermutung, daß es sich bei den *Myxobakterien* doch wohl um typische Bodenorganismen handele, versuchten wir zunächst die Primärentwicklung festzustellen. Im Trockenschrank bei 100° C sterilisierter Hasen- und Mäusemist wurde aus den Petrischalen direkt auf Erde geschüttet und diese etwas angehäuelt. Das Auslegen geschah bei Regenwetter in der Zeit vom 10. 11. bis 15. 11. 1943. Danach wurden die Mistkugeln unter sterilen Bedingungen in Petrischalen gesammelt, gut angefeuchtet und im Brutschrank bei 33° C gehalten. Am 21. 11. 1943 wurden bereits die ersten kleinen Fruchtkörper von *Myxococcus virescens* auf Hasenmist und *Myxococcus rubescens* auf Mäusemist gefunden. Eine weitere so vorbehandelte Kultur ergab in reichlicher Menge *Polyangium fuscum* und daneben *Myxococcus virescens*. In weiteren Versuchen wurde Mäusemist in Mullsäckchen trocken sterilisiert und auf Erde unter faulem Laub ausgelegt. Nach einer Exposition von 7 Tagen (29. 11. bis 7. 12. 1943) wurde wie oben erwähnt weiterbehandelt. Am 15. 12. 1943 stellte sich in reicher Menge *Myxococcus virescens* ein. Desgleichen wurde steriler Kaninchenmist in Mullsäckchen verpackt, am 27. 12. 1943 in Erde (leichter Sandboden) in etwa 10 cm Tiefe in einen Garten in Saarbrücken eingegraben, am 3. 1. 1944 steril entnommen und in Petrischalen weiterkultiviert. Die ersten *Myxococcus*-Fruchtkörper erschienen am 18. 1. 1944. Fast zu gleicher Zeit wurde in derselben Weise in einen Buntsandsteinverwitterungs- und einen Muschelkalkboden in Eckartsberga in Thüringen Kaninchenmist ausgelegt, ohne daß sich bei der darauffolgenden Kultur *Myxobakterien* einstellten. Im Dampftopf sterilisierter Mäusemist (an 3 aufeinanderfolgenden Tagen je eine Stunde sterilisiert) wurde mit einer

Erdaufschwemmung übergossen, die aus 5 g Gartenerde und 500 ccm aqua dest. bereitet war. Die Kulturen standen vom 19. 1. 1944 an im Brutschrank bei 33° C und zeigten bereits am 26. 1. 1944 in zahlreichen Parallelkulturen eine üppige Fruchtkörperentwicklung von *Myrococcus virescens*.

Der in der überwiegenden Mehrzahl positive Ausfall der Versuche bestätigt uns also, daß es sich um weitverbreitete Bodenbakterien handelt, die sich gleich anderen zahlreichen Formen der Bodenflora in der fruktifikativen Phase als koprophil erwiesen.

Die mehrfach in der Literatur gemachte und von JAHN noch 1936 geäußerte Feststellung, daß frischer Mist niemals *Myrobakterien* liefert, deutet darauf hin, daß das Substrat erst nach längerem Liegen im Freien einer Infektion zugänglich ist, die vom Boden ausgeht. Es soll nicht bestritten werden, daß das in vielen Fällen richtig ist, doch dürfte es nicht der einzige Weg der Infektion sein. In zahlreichen Kulturen von Kaninchen- und Meerschweinchenmist, der ganz frisch aus Ställen entnommen wurde, erhielten wir oft schon nach wenigen Tagen eine äußerst üppige Entwicklung von *Myrococcus virescens* und teilweise auch von *rubescens*. *Myrococcus rubescens* einmal auch auf Mäusemist, der ganz frisch direkt in eine angeschnittene Melonenfrucht abgelegt war, mit dem Erdboden also gar nicht in Berührung kam. Diese Befunde sprechen viel eher dafür, daß die Infektion nicht erst vom Boden her zu erfolgen braucht, der Kot vielmehr schon mit der Infektion den Darm verläßt. Folgender Fütterungsversuch mit weißen Mäusen erbrachte dafür den Beweis: Vom 22. 2. bis 26. 2. 1944 wurde täglich der Kot weißer Mäuse gesammelt und in Kultur genommen. Am 26. 2. 1944 wurde die normale Fütterung unterbrochen, den Mäusen mit einer sterilen Pipette eine Aufschwemmung sterilisierter Milch mit Zysten von *Chondromyces*-Fruchtkörpern verabreicht und in den nächsten 24 Stunden keine weitere Nahrung gegeben. Der nach der Fütterung sorgfältig gesammelte Kot zeigte in der Kultur am 9. 3. 1944 *Chondromyces*-Fruchtkörper neben einer sehr ausgiebigen Entwicklung von *Penicillium*, während in den vorher gesammelten Kotproben nur letzteres gefunden wurde. Das überaus häufige Auftreten der *Myrobakterien* auf dem Mist von Pflanzenfressern ist so zu erklären, daß schon mit der Nahrung diese Organismen aufgenommen werden und den Verdauungstraktus unbeschädigt durchlaufen. Dies ist auch der Grund dafür, weshalb gerade bei einem Allesfresser wie der Maus stets eine sehr üppige Entwicklung von *Myrobakterien* beobachtet wird.

Unverständlich scheint uns die Annahme JAHNS, die Infektion könnte auch durch den Wind erfolgen. Für hochorganisierte Formen, wie z. B. die *Chondromyces*-Arten mag dies noch zutreffen, da die Zysten an den Stielen der Fruchtkörper leicht abfallen, bei den *Myrococcaceen*, die zweifellos die verbreitetsten sind, ist das nicht so. Die Sporen der *Myrococcus*-Fruchtkörper sind von einer dicken Schleimhülle umgeben bzw. darin eingebettet. Sobald nun die entsprechenden

Außenbedingungen eintreten, die die Existenz der Fruchtkörper hinfällig machen, etwa starke Abnahme der Luftfeuchtigkeit, können wir deutlich beobachten, daß diese schleimigen Gebilde bald zusammenschrumpfen und sehr hart werden. In diesem Zustand läßt sich nur noch mit der Impfnadel etwas abkratzen. Aus einem so erhärteten Fruchtkörper ist eine Übertragung von Sporenmaterial durch den Wind unmöglich, doch wird eine Infektion des Mistes eher dadurch erfolgen können, daß Erdpartikelchen mit vegetativen Entwicklungszuständen auf denselben gelangen und dort in die fruktifikative Phase übergehen. Der weitaus einfachste Weg wird aber zweifellos der direkte sein, indem mit der Nahrung schon die Keime aufgenommen werden und durch den Organismus hindurchwandern.

b. Systematik.

Die Systematik der *Myxobakterien* ist von JAHN (1924) sehr eingehend behandelt worden. Im großen Ganzen läßt sich dieselbe ziemlich klar überblicken. Es sind eigentlich nur drei Haupttypen, die sich in der fruktifikativen Phase gut voneinander unterscheiden. Die einfachsten Formen sind die von JAHN als *Myxococcaceen* zusammengefaßt; eine Mittelstellung nehmen die als *Archangiaceae* und *Sorangiaceae* bezeichneten Arten ein und dem vierten Formenkreis gehören die höchst differenzierten *Myxobakterien* an, die *Polyangiaceae*.

1. *Myxococcaceae*.

(Allgemeine Charakteristik bei JAHN 1924.)

Myxococcus virescens Thaxter 1892: Sporengröße 1,8—2 μ . Weitere Beschreibung bei THAXTER. JAHN berichtet über *Myxococcus virescens*, daß ihm diese von THAXTER als grünlich-gelb bezeichnete Form niemals begegnet ist. Wir fanden *Myxococcus vir.* weitaus am häufigsten auf Mist von Damwild, Kaninchen, Meerschweinchen und Mäusen, der in Karlsruhe und der näheren und weiteren Umgebung (Rheinauen bei Karlsruhe, Winden/Pfalz) gesammelt wurde, desgleichen in dem Karlsruher Botanischen Garten.

Myxococcus rubescens Thaxter 1892 (*Myxococcus fulvus* Schroeter). Sporengröße 1,2—1,5 μ . Fruchtkörper rund bis länglich, oval mit mehr oder minder deutlichem Fuß. Fruchtkörper von hellrot glasiger Farbe bis dunkelrot. Durchmesser bis 300 μ . Auf Rotwild-, Hasen-, Meerschweinchen- und Mäusemist aus Karlsruhe und den Schwarzwaldvorbergen. Die von JAHN als *Myxococcus rubescens* var. *albus* beschriebene Form halten wir nicht für eine besondere Varietät. Sie wurde auch von uns beobachtet und ist sicher stoffwechselphysiologisch bedingt, worauf a. a. O. näher eingegangen wird.

Myxococcus megalosporus Jahn. Sporengröße bis 2,4 μ . Fruchtkörper rundlich, von brauner Farbe, Durchmesser der Fruchtkörper bis 150 μ , auf Rot- und Schwarzwildmist.

Myxococcus digitatus n. sp. Sporen 2 μ . Länge der Arme 80—120 μ , 20—30 μ breit. Fruchtkörper hellrot, farblich etwa mit den Fruchtkörpern von *Myxococcus rubescens* übereinstimmend. Es handelt sich um eine sehr ausgeprägte Form, die sich eindeutig von den als *Myxococcus digitatus* Quehl und *Myxococcus coralloides* Thaxter beschriebenen unterscheidet. Die

Art wurde einmal gefunden auf Damwildmist aus dem Karlsruher Stadtgarten. Sie zeichnet sich durch besonders üppige Fruchtkörperbildung aus,

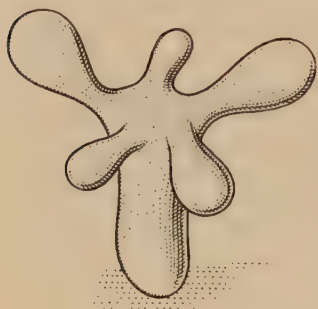


Abb. 1. *Myxococcus digitatus* nov. spec. Vergr. 320 mal.

so daß während der Hauptentwicklung alle andern Mikroorganismen, besonders Schimmelpilze, vollständig unterdrückt werden (Abb. 1).

Myxococcus coralloides Thaxter. Sporen etwa $1,5\mu$, Länge der Fruchtkörperfortsätze $30-40\mu$, Fruchtkörper zum Teil ziemlich flächig entwickelt, rasenbildend, stark verzweigt. Farbe ganz schwach rötlich. Einzelne Fruchtkörperstücke sehr schwer aus dem Verband zu lösen. Sehr häufig auf Hasen- und Rehmist aus Villingen (Zentralschwarzwald), einmal auf Kaninchenmist aus dem Forchheimerwald bei Karlsruhe.

2. Polyangiaceae.

Polyangium fuscum Thaxter 1904. Länge der Stäbchen $3-4\mu$, Zysten $50-60\mu$. Form kugelig bis oval, meist mehrere bis zahlreiche Zysten zu Häufchen vereinigt. In jungem Zustand hell, fleischfarben, dann in bräunlich bis tiefrostbraun übergehend. Auf sterilem Hasenmist aus Gartenerde von Karlsruhe und Saarbrücken isoliert.

Melittangium boletus Jahn 1924. Die Form wurde nur einmal auf Rehmist von Villingen im Schwarzwald gefunden.

Chondromyces crocatus Berkeley and Curtiss 1857. Länge der Stäbchen in den Zysten $5-6\mu$, Zysten $12 < 30\mu$. Form länglich, basales Ende beinahe eckig, apikales abgerundet, zuweilen mit zwei Ansatzstellen. Zysten in mehr oder minder großer Zahl an den Enden der Verzweigungen. In jungem Zustand weiß, dann gelb werdend. Zystophor schlank bis gedrunken, gerieft, in jungem Zustand weißlich, dann gelb bis orange werdend. Basales Ende trichterförmig erweitert. Höhe des Zystophors bis 1 mm. Einmal auf Damwildmist aus dem Karlsruher Stadtgarten.

Der zweifellos schwächste Punkt im derzeitigen System der *Myxobakterien* ist die Klassifikation. *Sorangiaceae* und *Polyangiaceae* zeichnen sich dadurch aus, daß mehr oder minder ausgeprägte Zysten gebildet werden und im Gegensatz zur großen Gruppe der *Myxococcaceae* die Stäbchen in der fruktifikativen Phase niemals in Kokkenform übergehen.

Besonders charakteristisch ist bei den *Polyangiaceae* die Ausprägung einer wesentlich differenzierteren Form des Fruchtkörpers als bei *Myxococcaceae*, *Archangiaceae* und *Sorangiaceae*. Wie a. a. O. noch zu berichten ist, zeigt sich aber innerhalb der *Polyangiaceae* eine Labilität der Fruchtkörperform, die soweit gehen kann, daß höchst differenzierte Arten wie etwa *Chondromyces* auf der Organisationsstufe der JAHNSchen *Archangiaceae* stehen bleiben. Es würde sich sicherlich als zweckmäßiger erweisen, die *Myrobakterien* nur in zwei große Gruppen zu teilen, in die *Myxococcaceae* und in die *Chondromycetaceae*, wobei sich für die letzteren eine fortschreitende Differenzierung von den einfachsten Formen etwa der Gattung *Archangium* bis zu der

höchstentwickelten Stufe der Gattung *Chondromyces* ergeben würde. Eine solche Einteilung würde auch den entwicklungsgeschichtlichen Verhältnissen gerecht werden.

In neuerer Zeit ist wiederholt in der Literatur (KRZEMIENIEWSKA 1933, RIPPEL und FLEHMIG 1933, STANIER 1940, FÄHRAEUS 1941) auf die morphologischen Beziehungen zwischen *Myxobakterien* und *Cytophaga*-Arten hingewiesen worden. Die Ähnlichkeit der von RIPPEL und FLEHMIG untersuchten *Itersonia ferruginea* mit *Myxococcus* ist so groß, daß sie vorschlagen, diese Mikroorganismen als *Hemi-Myxobakteria* den *Eu-Myxobakteria* anzugliedern. STANIER¹ will auf Grund seiner „Studies on the Cytophagas“ alle *Cytophagen*, die Mikrocyten bilden, mit dem neuen Genus *Sporocytophaga* in die Familie der *Myxococcaceae* stellen und der neuen Familie der *Cytophagaceae* mit dem Genus *Cytophaga* alle ohne Mikrocytenbildung zuordnen. Ein wesentlicher Unterschied zwischen den *Cytophaga*-Arten und den *Myxobakterien* ist offenbar der, daß erstere keine Fruchtkörper bilden. Auch ist die für die *Cytophagen* als typisch angesehene Substratspezifität (Zellulosespezialisten) unter den *Myxobakterien* längst nicht so ausgeprägt.

Mit welcher Berechtigung wir die *Cytophaga*-Arten zu den *Myxobakterien* rechnen können, müssen vergleichend morphologisch-physiologische Untersuchungen erweisen. Wir möchten uns vorerst einer Stellungnahme enthalten, da uns geeignete *Cytophaga*-Stämme bisher nicht zur Verfügung standen.

2. Allgemeine Kulturbedingungen für Myxobakterien.

Im Zusammenhang mit der Verbreitung haben wir auf das häufige Vorkommen der *Myxobakterien* auf dem Mist von Pflanzenfressern hingewiesen. Auch im Laboratorium gelingt es leicht, auf diesem natürlichen Substrat *Myxobakterien* zu kultivieren. Wir verfahren so, daß wir Mist von Hasen, Meerschweinchen und Mäusen, der sich als besonders vorteilhaft erwies, beimpften. Auf diese Weise erhält man leicht die entsprechenden Formen in reicher Menge. Gleichzeitig werden Begleitorganismen zum größten Teil ausgeschaltet, so daß man auf diese Weise am raschesten zu Reinkulturen gelangen kann. Entgegen den Literaturangaben (JAHN 1936) eignet sich als Kulturmedium auch bei 160° trocken sterilisierter Mist, allerdings sind Wachstum und Fruchtkörperbildung hier wesentlich geringer im Vergleich zu Autoklavsterilisation bei 100° C.

Abgesehen von den verschiedenen Angaben über die Kulturen auf natürlichem Substrat (siehe JAHN 1924 und 1936), liegen über die Kulturbedingungen auf künstlichen Nährböden nur wenige Daten vor. LIESKE (1926) führt als Grund, weshalb bei den üblichen Bodenuntersuchungen die *Myxobakterien* bisher übersehen wurden, an, daß ein Wachstum derselben

¹ Herrn R. Y. STANIER von den Bact. Labor. Indiana University, Bloomington, Indiana, U. S. A., danke ich für die Übersendung seiner Cytophagen-Separate.

auf unsern gewöhnlichen Isolierungsnährböden nicht möglich ist. Wir nehmen an, daß LIESKE mit Isolierungsnährböden Agar und Gelatine meint und haben gerade auch diese Substrate auf ihre Brauchbarkeit für die Kultur der *Myxobakterien* untersucht und sind hierbei zu ganz andern Ergebnissen gekommen, worüber wir im Folgenden berichten.

Um Einblick in die allgemeinen Kulturbedingungen zu bekommen, bereiteten wir uns zunächst eine Anzahl flüssiger und fester Nährböden und verwendeten als Grundlage möglichst natürliche Substrate. Von verschiedenen Mistproben wurden Auszüge hergestellt und diese direkt oder mit Agar verarbeitet beimpft. Wir beschränkten uns darauf, *Myxococcus rubescens*, *virescens* und *Polyangium fuscum* zu untersuchen. Verfolgt wurde die Entwicklung der aus den Fruchtkörpern entnommenen Sporen. Über den Vorgang der Sporenkeimung hat schon BAUR (1904) einige Angaben gemacht. Er strich Sporen von *Myxococcus ruber* am Deckglas aus und gab darauf einen Tropfen Mistdekot. Schon nach 5 Stunden trat Keimung ein. Für *Myxococcus rubescens* lauten die Angaben wieder anders, und THAXTER (1897) erzielte Keimung, indem er die Sporen in geschmolzenen Nähragar einschloß und erstarren ließ, eine Methode, mit der BAUR bei sämtlichen *Myxococcus*-Arten keinen Erfolg hatte. KOFLER (1913) weist ferner die BAURschen Angaben, das KOCH'sche Plattenverfahren eigne sich nicht zur Kultur der *Myxobakterien*, zurück und berichtet von häufigen Beobachtungen der Sporenkeimung im Innern des Agars. Daß innerhalb verschiedener Rassen von *Myxococcus rubescens* solche Unterschiede im physiologischen Verhalten bestehen, erscheint uns recht zweifelhaft. Diese divergierenden Untersuchungsbefunde lassen sich auf Grund eigener Erfahrungen eher darauf zurückführen, daß fast immer Substrate Verwendung fanden, die völlig unzureichend definiert waren. Ein Nährboden aus einer Mistabkochung + 2% Agar (BAUR 1904) kann bezüglich der Konzentration der Nährstoffe derartigen Schwankungen unterliegen, daß eindeutige Versuchsergebnisse nicht erwartet werden können.

Unsere eigenen Kulturversuche führten zu folgenden Ergebnissen: Bei der Kultur im hängenden Tropfen keimten Sporen von *Myxococcus rubescens* in Meerschweinchenmistwasser (10 g frischer Meerschweinchenmist in 5 cem aqua dest. 10 Minuten gekocht und filtriert) unverdünnt und in Verdünnungen von 1 : 1 und 1 : 3 nicht aus. Die Beobachtungen erstreckten sich auf 4 Tage. Ebenso wenig fand eine Keimung in Kaninchenmistwasser statt, das auf die gleiche Weise hergestellt war, und wovon die selben Verdünnungen zur Anwendung kamen. Auch das Alter der Sporen spielte dabei keine Rolle. Auch völlig eingetrocknetes Sporenmaterial konnte nicht zur Keimung gebracht werden.

Kaninchenmistwasser wurde ferner in unverdünntem Zustand auf Gipsblöcke gegossen und diese beimpft. Eine Keimung war nicht zu beobachten, konnte aber nach der Bildung neuer Fruchtkörper angenommen werden. Diese traten nur einmal in mehreren Versuchsserien auf nach einer Kulturdauer von 6 Tagen bei Zimmertemperatur. Sie waren außerordentlich klein und unscheinbar, ein Zeichen also einer sehr schwachen vegetativen Entwicklung. Mit den erwähnten Mistwasserauszügen hatten wir kaum Erfolg und führten das darauf zurück, daß durch das Kochen des Mistes und die wiederholten Sterili-

sierungen der Auszüge ungünstige stoffliche Veränderungen eingetreten waren. Mistwasserauszüge, die ohne vorheriges Sterilisieren hergestellt wurden, ließen vielleicht andere Ergebnisse erwarten. Wir gingen daher zu einer keimfreien Filtration der Auszüge über.

Zu 5 g Kaninchen- bzw. Mäusemist wurden je 100 ccm aqua dest. gegeben und das Ganze unter öfterem Umrühren bei 32 bzw. 21° C 24 Stunden stehen gelassen. Nach einer ersten Filtration durch Faltenfilter wurden die Auszüge einer keimfreien Filtration durch Berkefeld-Filter unterzogen und dann zur Anlage von Tröpfchenkulturen verwendet. Geimpft wurden Sporen von *Myxococcus rubescens*- und *virescens*-Reinkulturen. Nach 24, 36 und 48 Stunden durchgeführte Kontrollen ließen an denselben keinerlei Veränderungen erkennen. Nur in einem einzigen Fall gelang die Sporenkeimung im flüssigen Medium. In einem Erdextraktauszug² zeigten *Myxococcus rubescens*-Sporen nach 15 Stunden bereits alle Übergänge von der keimenden Spore bis zum fertigen Stäbchen. In den Verdünnungen 1:1 und 1:10 setzte die vegetative Entwicklung sogar schon nach 7 Stunden ein. Diese Feststellung ist besonders bemerkenswert einmal im Hinblick auf die Ökologie der *Myxobakterien* als Bodenmikroorganismen, andererseits erwies sie prinzipiell die Verwendbarkeit flüssiger Substrate für *Myxococcus*-Arten, während nach SOLUTZEW (1941) die *Polyangiaceae* in solchen Medien nur in Gegenwart fester Stoffe eine Entwicklung zeigten.

Die weitaus günstigsten Kulturergebnisse wurden auf festen Nährböden erzielt. Hierüber finden sich auch häufige Angaben in der Literatur (JAHN 1936). Mit Erfolg wurden vor allem *Myxococcus*-Arten gezüchtet, dagegen blieb die Kultur mit den höchstentwickelten *Polyangiaceae* erfolglos. Übereinstimmend mit den Angaben der meisten Autoren eignet sich der Mist von Hasen, Meerschweinchen und Mäusen besonders gut als Substrat. Es spielt entgegen den bisherigen Beobachtungen keine Rolle, ob es sich um frischen oder älteren Mist handelt, ja es erwies sich sogar, daß in sehr stark ausgewaschenem Substrat die Entwicklung der *Myxobakterien* weniger günstig verläuft. Zur Herstellung von Nährböden benutzten wir fast ausschließlich Mist von Meerschweinchen und Mäusen. Es wurden Abkochungen bereitet, wobei auf 300 ccm aqua dest. 10 g Meerschweinchen- bzw. 5 g Mäusemist kamen. Die Abkochungen wurden filtriert und dienten direkt oder in Verdünnungen 1:1, 1:3 und 1:5 als Grundlage zu Agarnährböden. Weitere Kulturmedien waren ein Erdaufschwemmungsagar³ mit Filtratverdünnungen 2:1, 1:1 und 1:3 und ein Erdextraktagar² mit Extraktverdünnungen 1:1, 10:1 und 100:1.

In sämtlichen angegebenen Agarnährböden war das Wachstum von *Myxococcus rubescens*, *Myxococcus virescens* und *Polyangium fuscum* sehr gut, die Fruchtkörperbildung normal und von der

² 50 g Gartenerde mit H₂O im Soxhlet extrahiert.

³ 5 g Gartenerde + 500 ccm H₂O unter öfterem Schütteln 24 Stunden stehen gelassen und abfiltriert.

auf natürlichem Substrat nicht zu unterscheiden. Unterschiede im Verhalten gegenüber Erdaufschwemmungsagar zeigten sich nur insofern, als *Myrococcus rubescens* in der Verdünnungsstufe 2:1 die beste Fruchtkörperentwicklung zeigte, während *Myrococcus virescens* in den Konzentrationen 2:1 und 1:1 vegetativ stärker hervortrat und der Schwerpunkt der fruktifikativen Entwicklung bei 1:3 lag. Der Erdextraktagar erwies sich als besonders günstig für die Entwicklung von *Polyangium fuscum*, das in den Verdünnungsstufen 100:1 und 10:1 zahlreiche große Zystenhaufen bildete, während bei 1:1 die Fruchtkörperentwicklung wesentlich schwächer war. Diese Ergebnisse dürften zur Genüge beweisen, daß sich diese Substrate als Isolierungsnährböden für die am häufigsten auftretenden Arten von *Myrobakterien* durchaus eignen. Die Schwierigkeiten, die sich der Kultur der *Polyangiaceae* entgegenstellen, sind nicht nur substratbedingt, sondern stehen mit Faktoren im Zusammenhang, auf die später näher eingegangen wird.

3. Stoffwechselversuche.

Die Angaben über den Stoffwechsel der *Myrobakterien* sind sehr spärlich. JAHN konnte noch 1936 als Ergebnis eigener Versuche und solcher anderer Autoren zusammenfassend sagen, daß es auf synthetischen Nährböden nie gelingt, eine normale Entwicklung zu erhalten. In Anbetracht der Lückenhaftigkeit der Untersuchungsbefunde besagt eine solche Schlußfolgerung sehr wenig, und es ließ sich in der Tat auch zeigen, daß sie falsch ist. Synthetische Nährböden ermöglichen eine Beurteilung der Wachstumsbedingungen der *Myrobakterien* sowohl in der vegetativen als auch in der fruktifikativen Phase. Sie wurden bisher nur in sehr geringem Umfang verwendet und umfaßten einige Kohlenhydrat- und Stickstoffnährböden bzw. Kombinationen beider. Dextrose wird nach BAURS Angaben (1904) als Kohlenstoffquelle ausgenutzt. JAHN (1936) schreibt, daß für den Stoffwechsel eines Schwarzes im Ganzen der Eindruck bleibt, daß einfachere Kohlenhydrate als Kohlenstoffquelle ausgenutzt werden können. Zellulose scheint allgemein nicht verwendet zu werden. Einfache Stickstoffverbindungen sollen ebenfalls unzureichend sein, auch wenn sie als Zusatz zu Zuckern verwendet werden.

a) Die Verwertbarkeit der Kohlenhydrate.

Bei der Beurteilung der Verwendbarkeit der Kohlenstoffquellen muß berücksichtigt werden, daß Beziehungen zwischen der Kohlenstoff- und Stickstoffernährung bestehen. Häufig ist die Verwertbarkeit der Kohlenstoffquelle stark abhängig von der Wahl der N-Quelle. Manche Mikroorganismen können nur gemeinsame Kohlenhydrat-Stickstoffquellen verwenden.

Um ein einigermaßen klares Bild vom Verwendungsstoffwechsel der Kohlenhydrate zu gewinnen, wurden zunächst diese allein und dann in Verbindung mit verschiedenen N-Quellen geprüft.

Dem Grundmedium (1,5% Agar) wurden die betreffenden Kohlenhydrate in einer Konzentration von 0,5% zugesetzt. Als C-Quellen dienten von den Mono- und Disacchariden Glykose, Laevulose, Galaktose, Arabinose, Saccharose, Lactose und Maltose, von den Polysacchariden Stärke; ferner prüften wir die Verwertbarkeit von Glycerin. Als Mindestdauer der Kulturen wurden 7 Tage festgehalten, da es sich herausstellte, daß eine Verschiebung von der vegetativen nach der fruktifikativen Phase der Entwicklung oft erst nach mehreren Tagen eintritt und eine vorzeitige Beurteilung der Versuche zu ganz falschen Schlüssen führen kann. In der überwiegenden Zahl der Fälle war aber ein Zusammenhang zwischen den zwei Entwicklungsphasen unverkennbar, so daß eine gute Fruchtkörperbildung stets auch der Ausdruck einer entsprechenden vegetativen Entwicklung war.

Für *Myxococcus* ergab sich (einige Daten sind in Tab. I aufgenommen) eine gute Verwertbarkeit der meisten C-Quellen. Besonders günstig war die Entwicklung auf Glykose, Galaktose, Maltose und Saccharose. Ein ausgesprochen schlechtes Wachstum war auf Laevulose zu verzeichnen. Auffallend war eine eindeutige Entwicklungshemmung auf Glykose, sowohl in der vegetativen wie in der fruktifikativen Phase, wenn die Übertragung von Maltose vorgenommen wurde, während sich bei einer solchen von Mono- auf Monosaccharid eine Unterbrechung in der Entwicklung kaum feststellen ließ. Eine hemmende Wirkung von Glykose auf die Entwicklung und den Zelluloseabbau wurde auch von IMSCHENETZKY (1941) nachgewiesen. *Myxobacterium Hutschinsonii* verliert schon bei Zugabe von 0,3% Glykose zum Nährboden seine Vermehrungsfähigkeit und baut keine Zellulose mehr ab. Monosaccharide unterdrücken seine Vermehrung viel stärker als Polysaccharide. Der erwähnte Organismus ist stoffwechselphysiologisch erst dann einer vergleichenden Betrachtung mit *Myxococcus* zugänglich, wenn die verwandtschaftlichen Beziehungen beider Formen besser geklärt sind.

Bezüglich der fruktifikativen Phase der Entwicklung ist ferner bemerkenswert, daß die Form und die Farbe der Fruchtkörper auf den verschiedenen Nährböden gewissen Schwankungen unterworfen sind, ohne daß dabei ein eigentlich wirksames Prinzip erkennbar wäre. In den Fällen, wo Glycerin als C-Quelle verwendet wurde, zeigte die Fruchtkörperbildung auffallende Abweichungen. Die Fruchtkörper waren kaum gestielt, groß, länglich und die Oberfläche deutlich gewellt (Abb. 2). In diesem Zusammenhang verweisen wir auf die Feststellung SABOURAUD's (1910), daß die Form der Bakterienkultur durch Glycerin verändert wird, ohne daß man eine Assimilation desselben in irgend einer Form feststellen könnte.



Abb. 2. Wachstum von *Myxococcus rubescens* auf Glycerinagar. Vergr. 155 mal.

Sehr typisch war auch die Ausbildung von *Myxococcus rubescens* auf Galaktose (Abb. 3). Die vorhandenen Kolonien zeigten im Zentrum eine charakteristische Fruchtkörperbildung. Die Kolonien selbst bestehen aus Anhäufungen von Einzelindividuen, die im Übergang von der Stäbchen- in die Kokkenform begriffen sind.



Abb. 3. Wachstum von *Myxococcus rubescens* auf Galaktose-Agar. Vergr. 75 mal.

Außerhalb der scharf umrandeten Kolonie liegen ungerichtete Stäbchen in größerer Anzahl. Das Ganze macht den Eindruck, als wenn von der Mitte der Kolonie ein Reiz ausginge, der sich über eine bestimmte Zone hin erstreckt, in der sich der Übergang von der vegetativen in die fruktifikative Phase vollzieht.

Einige sich auf mehrere Monate erstreckende Versuche zur Prüfung des Zelluloseabbaus verliefen negativ. Der enzymatische Abbau des Polysaccharids Stärke ließ sich direkt nachweisen, indem sowohl um den Schwarm wie im unmittelbaren Bereich der Fruchtkörper die Stärkereaktion unterblieb.

Während bei *Myxococcus rubescens* auf den meisten C-Nährböden die Gesamtentwicklung, also vegetative und fruktifikative Phase abläuft, ging die Entwicklung bei *Myxococcus virescens* und *Polyangium fuscum* meist nicht über ein schwaches vegetatives Stadium hinaus.

Die mitgeteilten Befunde lassen zunächst die Frage nach dem N-Bedürfnis offen. Die Spuren von Stickstoff, die Agar-Agar (2 Tage gewässert) enthält, genügten offenbar zur vegetativen und fruktifikativen Entwicklung. JAHN (1924) gibt Ähnliches für *Melittangium* an und beobachtete, daß der Schwarm sich auf reinem Agar ohne jeden Zusatz ausbreitet und einen Ring normaler Fruchtkörper bildet. Nach unseren eigenen Erfahrungen kam die Entwicklung in keinem Fall über ein ganz schwaches vegetatives Wachstum hinaus, wenn dem Agar auch noch die entsprechenden Kohlenhydratquellen entzogen wurden. Es war in diesem Zusammenhang daher von besonderem Interesse, das C-N-Verhältnis genauer zu untersuchen.

b) Die Verwertbarkeit des Stickstoffs.

Bezüglich der Verwertbarkeit der N-Verbindungen macht JAHN (1936) einige Angaben. Er schreibt, daß Ammoniumsalze oder Nitrate als Zusatz zu Zuckern nicht wirken, wohl aber Pepton in geringer Menge. *Melittangium* und *Chondromyces* sollen nach Angaben von SOLUTZÉWA (1941) mineralischen Stickstoff und Aminosäuren nicht, hochmolekularen N dagegen gut verwerten.

Zur Frage der Klärung der Brauchbarkeit verschiedener N-Quellen haben wir in einer Reihe von Versuchsserien *Myxococcus rubescens*

und *Myxococcus virescens* geprüft. Dem Agar (1,5%) wurden die N- bzw. C-Gaben 0,5%ig zugesetzt. Die vegetative sowohl wie die fruktifikative Entwicklung wurde in regelmäßigen Zeitabständen registriert und in folgender Tabelle I für *M. rubescens* wiedergegeben.

Die starken Wachstumseffekte, die auf den verschiedenen C-N-Nährböden zu verzeichnen sind, erweisen die ernährungsphysiologisch wichtige Rolle dieser Stoffe. Von den anorganischen Stickstoffverbindungen wirkt Calciumnitrat besser als Ammoniumnitrat, mit Ausnahme von letzterem in Verbindung mit Glycerin. Harnstoff wird gleichmäßig gut verwertet und wirkt mehr oder minder günstiger als Asparagin. Die nutritive Wirkung der Glykose scheint in Gegenwart von Ammoniumnitrat herabgesetzt zu sein, die von Galaktose wird durch sämtliche der verwendeten N-Quellen erhöht. Auch Laevulose, die als solche ein schlechter Kohlenhydratnährboden ist, erweist sich nach Zusatz der verschiedenen N-Verbindungen als recht brauchbar.

Von den Di- und Polysacchariden wurde nur Maltose in Gegenwart organischen Stickstoffs besser verwertet, die Verwertbarkeit von Saccharose und Kartoffelstärke nicht günstiger beeinflusst. Glycerin erwies sich mit und ohne Stickstoff gleich wirksam, wenn auch in Gegenwart des letzteren der Schwerpunkt der Entwicklung zuerst eindeutig auf die vegetative Phase verlagert ist.

Daß innerhalb der *Myxococcaceen* selbst ein ziemliches Spezialistentum besteht, erweist sich am Verhalten von *Myxococcus virescens*, der auf mineralischem Stickstoff ein ausgesprochen schlechtes Wachstum zeigte, organische N-Verbindungen wurden dagegen sehr gut verwertet und bewirkten starke Zuwachseffekte. Entgegen den Ergebnissen mit *Myxococcus rubescens* war hier auch Glykokoll recht brauchbar. Von einer starken Spezialisierung berichtet auch die Literatur. SOLUTZEWA (1941) fand, daß für *Melittangium* und *Chondromyces* nicht einmal Aminosäuren als N-Quellen genügen, sondern nur der hochmolekulare Stickstoff verwertet werden kann. An *Melittangium* ließ sich das nicht nachprüfen. *Chondromyces* dagegen nimmt ernährungsphysiologisch eine Sonderstellung ein, die aufs engste mit einem symbiontischen Verhältnis verknüpft ist, worüber a. a. O. noch ausführlicher die Rede sein wird.

An höheren Eiweißverbindungen wurden ferner noch verschiedene Gelatinenährböden und Löffler-Serum geprüft. Auf Regenwasser- und Mistgelatine war die Verflüssigung relativ schwach, auf Fleischbouillongelatine dagegen sehr stark. Die Entwicklung verlief hier rein vegetativ und entsprach im Umfang den jeweiligen Verflüssigungszonen.

Zeigte das Wachstum von *Myxococcus rubescens* auf fast allen der bisher geprüften Nährböden gewisse Schwankungen, die wohl in Form und Farbe der Fruchtkörper zum Ausdruck kamen, aber im wesentlichen das Aussehen einer *Myxococcus*-Kultur nicht zu verwischen vermochten, so ergab sich auf Löffler-Serum ein ganz anderes Bild. *Myxococcus rubescens* zeigte auf diesem Substrat eine Wuchsform, die eher

Tabelle I. *Wachstum von Myxococcus rubescens auf verschiedenen C- und C-N-Nährböden, überimpft von reinem Agar.*

Versuchsbeginn 30. 8. 44	1. Kontrolle 4. 9. 44		2. Kontrolle 6. 9. 44		Bemerkungen
	veg.	frukt.	veg.	frukt.	
Glykose	++	++	+++	+++	Normal geformte, deutlich gestielte Fruchtkörper
Galaktose	+	—	++	++	Kleine hellgefärbte Fruchtkörper
Laevulose	—	—	+	—	
Saccharose	++	++	+++	+++	Normale Fruchtkörperbildung
Maltose	+	+	++	++	Normale Fruchtkörperbildung Farbe mattrot
Kartoffel- stärke	++	++	+++	+++	Zahlreiche, normalgeformte blaß- rote Fruchtkörper
Glycerin	+++	++	+++	+++	Kleine bis mittlere, typisch gestielte Fruchtkörper
Glykose $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	++	++	+++	+++	Intensiv gefärbte Fruchtkörper mit deutlicher Stielbildung
Glykose NH_4NO_3	++	+	++	++	Fruchtkörper hellrot, keine Fuß- bildung
Glykose Harnstoff	++	++	+++	+++	Mattrote, typisch geformte Frucht- körper
Glykose Asparagin	++	+	+++	+++	Auffallend große, glasig aussehende Fruchtkörper
Galaktose $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	++	—	++	++	Kleine, normalgeformte Frucht- körper
Galaktose NH_4NO_3	++	+	++	++	Schwach gefärbte, normale Frucht- körper
Galaktose Harnstoff	+++	+++	+++	+++	Mattrote, typisch geformte Frucht- körper
Galaktose Asparagin	++	+++	+++	+++	Typische Fruchtkörperbildung in der Mitte der Kolonien
Laevulose $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	++	±	+++	+++	Fruchtkörper klein und ohne Fuß
Laevulose NH_4NO_3	++	±	++	+++	Deutlich gestielte, normale Frucht- körper
Laevulose Harnstoff	++	+++	++	++	Stark gestielte, hellrote Frucht- körper
Laevulose Asparagin	+	±	++	+++	Normal geformte, hellrote Frucht- körper

Tabelle I. (Fortsetzung.)

Versuchsbeginn 30. 8. 44	1. Kontrolle 4. 9. 44		2. Kontrolle 6. 9. 44		Bemerkungen
	veg.	frukt.	veg.	frukt.	
Saccharose $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	++	+	++	++++	Normale, hellrote Fruchtkörper
Saccharose NH_4NO_3	++	+	++	++	Blaßrote, kleine Fruchtkörper
Saccharose Harnstoff	++	++++	++	++++	Kleine, mattrote Fruchtkörper
Saccharose Asparagin	++	+	++	++++	Große, normale, mattrote Fruchtkörper
Maltose $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	+	+	++	++	Leuchtend rote, normale Fruchtkörper
Maltose NH_4NO_3	+	+	++	++	Normale, hellrote Fruchtkörper
Maltose Harnstoff	++	++	+++	++++	Typische Fruchtkörperform
Maltose Asparagin	++	++	+++	++	Deutlich gestielte, normale Fruchtkörper
Kart.-Stärke $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	++	+	++	++	Große, hell gefärbte Fruchtkörper
Kart.-Stärke NH_4NO_3	++	+	++	++	Normale, schwach gefärbte Fruchtkörper
Kart.-Stärke Harnstoff	++	++	++	++++	Blaßrote, substrat-typisch geformte Fruchtkörper
Kart.-Stärke Asparagin	++	++	+++	++	Normale, hellrote Fruchtkörper
Glycerin $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	++	—	++	++	Unregelmäßig geformte große Fruchtkörper
Glycerin NH_4NO_3	++	+	+++	++++	Hellrote Fruchtkörper ohne auffallende Formveränderung
Glycerin Harnstoff	+++	—	+++	++++	Substrat-typische Form der Fruchtkörper
Glycerin Asparagin	+++	+	+++	++++	Große Fruchtkörper von substrat-typischer Form

an eine Hefekultur erinnerte, wenn wir zunächst von der Färbung der Zellen absehen. Typisch war eine flächige Ausbreitung und gleichzeitig starke Vermehrung der Stäbchen. Nach einer 14tägigen Kulturzeit hatte sich eine Kolonie gebildet, die auf der Oberfläche leichte Runzelungen aufwies und keinerlei Farbstoffbildung erkennen ließ. Bei

der mikroskopischen Untersuchung dieser Kolonie fanden sich nur Kokken. Es handelt sich also um die fruktifikative Phase in einer ganz anderen Erscheinungsform. Unser Zweifel, daß es sich vielleicht um eine Verunreinigung handeln könnte, wurde dadurch behoben, daß von den Kolonien auf Löffler-Serum eine Reihe von Abimpfungen auf Mistagar-Nährböden vorgenommen wurde und darauf schon nach wenigen Tagen die typischen *Myrococcus*-Fruchtkörperformen zu sehen waren. Leider konnten wir aus äußeren Gründen diese interessante Beobachtung nicht weiter verfolgen und müssen die Suche nach der wirksamen Komponente dieses Nährbodens auf einen späteren Zeitpunkt verschieben.

4. *Chondromyces crocatus*, eine symbiotische Form der Myxobakterien.

Übereinstimmend wird in der Literatur (JAHN 1924, PINNOY 1913 und 1921) berichtet, daß es nicht gelingt, *Chondromyces crocatus* in Reinkultur zu züchten, ja selbst auf sterilisiertem Mist, einem möglichst natürlichen Substrat, wurden keinerlei Erfolge erzielt.

Wir hatten *Chondromyces crocatus* auf Damwildmist des Karlsruher Stadtgartens gefunden und zunächst eine Reihe von Rohkulturen hergestellt. Sie dienten als Ausgangsmaterial für zahlreiche Versuche, die der Frage der Reinzüchtung und der Ernährungsbedingungen galten. Entgegen den Befunden der oben erwähnten Autoren bekamen wir stets ein üppiges Wachstum von *Chondromyces*, wenn wir Zysten der Fruchtkörper oder ganze Fruchtkörper auf verschiedene Mistproben überimpften. Besonders schöne Kulturen fanden wir auf sterilisiertem Mist von Meerschweinchen und Mäusen, wo nach wenigen Tagen ein üppiger Wuchs von Fruchtkörpern zu verzeichnen war. Auf Mäusemist, der mit *Chondromyces*-Zysten beimpft war, beobachteten wir auffallend kräftig entwickelte Fruchtkörper, die direkt aus dicken, blaugrünen Schleimklumpen hervorwuchsen. Eine genauere Untersuchung derselben ergab eine Anhäufung von halbmondförmigen Konidien einer *Fusarium*-Art. Diese Erscheinung ließ uns vermuten, daß die Entwicklung von *Chondromyces* vielleicht doch von anderen Mikroorganismen abhängig sein könnte. Dagegen sprach aber zunächst die ausgezeichnete Fruktifikation auf sterilisiertem Mist nach Übertragung von steril abgenommenen Zysten aus unseren Rohkulturen. Auch Meerschweinchen- oder Mäusemist-Agar bot den darauf geimpften Zysten von *Chondromyces*-Fruchtkörpern beste Entwicklungsmöglichkeiten, was auch in einer vollkommen normalen Fruktifikation zum Ausdruck kam. An solchen, durch steril abgenommene Zysten erhaltenen vermeintlichen Reinkulturen auf Agar-Nährböden hatten wir laufend Untersuchungen angestellt, um den morphologischen Bau der Fruchtkörper näher kennen zu lernen. Dabei fiel auf, daß am Fuße derselben häufig *Amöben* saßen. Wir hatten diese zu wiederholten Malen beobachtet und daraus gefolgert, daß sie in irgend einem Zusammenhang mit der Entwicklung der *Myxobakterien*

stehen mußten. Um zu absoluten Reinkulturen zu gelangen, wurden daher Zysten solcher Rohkulturen zunächst in einer Chlorkalklösung⁴ äußerlich sterilisiert⁵, zweimal mit sterilem aqua dest. abgespült und auf Mäusemistagar aufgelegt. Während einer Kulturdauer von 7 Wochen fand keinerlei Entwicklung statt. Nach Druck entwichen aus solchen Zysten normale Stäbchen, die sich auf dem Nährboden nur ganz schwach vermehrten. Auf diese Weise gelang es auch, kleine Stäbchenschwärme auf Mäusemistagar über 42 Tage rein zu kultivieren, ohne daß irgendwelche Anzeichen einer Fruchtkörperbildung auftraten.

Am 22. 4. 1944 setzten wir neue Kulturen mit äußerlich sterilisierten Zysten von *Chondromyces* auf Mäusemistagar an. In Parallelversuchen impften wir zu diesen Zysten *Dictyostelium mucoroides*, einen *Myxomyceten*, den wir aus dem Zentralbüro für Schimmelpkulturen in Baarn bezogen hatten. Während die Kulturen ohne *Dictyostelium* bis zum 7. 6. 1946 völlig unverändert blieben, nach Zerdrücken derselben sich ebenfalls nur eine äußerst geringe Vermehrung der Stäbchen zeigte, war zum selben Zeitpunkt in den Kulturen mit *Dictyostelium* Fruchtkörperbildung von *Chondromyces* aufgetreten, die dadurch besonders auffiel, daß die Fruchtkörper direkt an Sporangienträgern von *Dictyostelium* saßen (Abb. 4).

Außerdem waren Fruchtkörper auch auf dem Substrat in größeren Mengen aufgetreten. Die mehrfach wiederholten Versuche führten stets wieder zu einer Bestätigung dieses Ergebnisses. Damit war der eindeutige Beweis erbracht, daß es sich bei *Chondromyces crocatus* um eine Form der *Myxobakterien* handelt, die symbiontisch lebt, wobei nicht daran gezweifelt werden kann, daß sie nicht streng an einen bestimmten Partner gebunden ist, sondern daß wahrscheinlich *Bakterien*, *Myxomyceten* und gelegentlich auch höhere *Pilze* dieses Zusammenleben bestimmen können. Die häufige Beobachtung der *Amöben* mit *Chondromyces* in Rohkulturen spricht ebenfalls dafür. Es wird weiteren Untersuchungen vorbehalten sein müssen, verschiedene Mikroorganismen, die auf natürlichem Substrat mit *Myxobakterien* auftreten, bezüglich ihrer symbiontischen Zusammenhänge mit *Chondromyces crocatus* zu untersuchen. Darüber hinaus wird die Art des Zusammenlebens anderer *Myxobakterien* aus der Gruppe der *Polyangiaceae* zu prüfen sein. Ebenfalls müssen weitere Forschungen die Frage klären, inwieweit es sich in dem einen erwiesenen Fall des

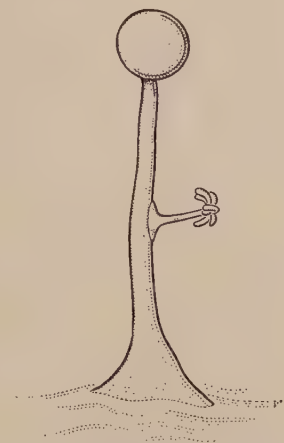


Abb. 4. Fruktifikation von *Chondromyces crocatus* auf *Dictyostelium mucoroides*. Vergr. 60 mal.

⁴ 140 ccm H₂O, 10 g Chlorkalk.

⁵ Einwirkungsdauer der Chlorkalklösung 2 Minuten.

Zusammenlebens wirklich um ein symbiontisches Gleichgewicht handelt, oder ob es sich mehr als ein symbiontischer Parasitismus erweist. Für die untersuchten *Myrococcaceen*, die primitiven *Myrobakterien* also, gilt jedenfalls, daß sie in Reinkultur gut gedeihen. Aus mehreren Versuchsreihen mit Mischkulturen von *Myrococcus rubescens* und *Bacillus vulgaris* konnten keinerlei Anhaltspunkte für die Abhängigkeit eines Zusammenlebens dieser beiden Organismen gefunden werden.

5. Die Abhängigkeit der Fruchtkörperform vom Nährmedium.

Das Kennzeichnende im Entwicklungsablauf der *Myrobakterien* ist die Ausbildung von Fruchtkörpern. Diese sind in Form und Farbe für die einzelnen Arten sehr charakteristisch. Am einfachsten sind sie bei den *Myrococcaceen* als rundliche Schleimklümpchen ausgebildet. Die höchstdifferenzierten Formen finden wir bei den *Polyangiaceae* als verästelte Gebilde mit Cystophor und Zysten. Die vorherrschenden Farbstoffe sind rot, gelb und grün.

Im Verlaufe unserer Untersuchungen konnten wir uns davon überzeugen, daß insbesondere die Form der Fruchtkörper eine starke Abhängigkeit vom Substrat zeigt. Schon so einfache Fruchtkörper wie die der *Myrococcus*-Arten können auf verschiedenen Nährböden außerordentlich variieren, und zuweilen treten dann Formen auf, die beinahe den Eindruck einer besonderen Species erwecken. Zur genauen Kennzeichnung einer solchen sind daher Kulturen auf möglichst natürlichen Substraten, wie etwa Mistagarnährböden, erforderlich.

Abgesehen von kleineren Veränderungen haben wir einige für das Substrat sehr typische Fruchtkörperformen herausgestellt, die Beispiele einer starken chemomorphotischen Wirkung sind. Am deutlichsten kommt dies in den Abbildungen 5, 6 und 7 zum Ausdruck.

In allen drei Fällen handelt es sich um denselben Organismus *Myrococcus rubescens* in Reinkultur auf verschiedenen Substraten. Normalerweise ist dieser Fruchtkörpertyp, so wie wir ihn in Abb. 5a sehen, eine besonders üppige Fruktifikation auf Asparaginagar. Auf Glykose-Calciumnitrat-Agar (Abb. 5b) wird eine deutliche Stielbildung sichtbar, und völlig anders gestaltet erscheint *Myrococcus rubescens* auf Harnstoff-Agar (Abb. 5c). Die Fruchtkörper haben hier die rundliche Form ganz verloren und zeigen sich als langgezogene niedrige Wülste. Mit ziemlichem Konstanz Konstanz vorhanden ist, auch in Verbindung mit Kohlenhydraten. Abweichend vom Normaltyp ist die Fruchtkörperbildung auf Galaktose, worauf schon früher im anderen Zusammenhang (siehe Abb. 3) hingewiesen wurde. Ein stärkerer formativer Einfluß wurde ferner auf Calciumnitrat-Agar (Abb. 6) festgestellt.

Die Fruchtkörper waren hier durch seitliche Auswüchse besonders auffallend gestaltet. Auf Löffler-Serum entstanden, wie bereits erwähnt, an Stelle von Fruchtkörpern nur flächenhafte, runzlige Gebilde ohne

jede Farbstoffbildung. Auch Glycerin (siehe Abb. 2) übte einen starken Einfluß auf die Form des Fruchtkörpers aus.

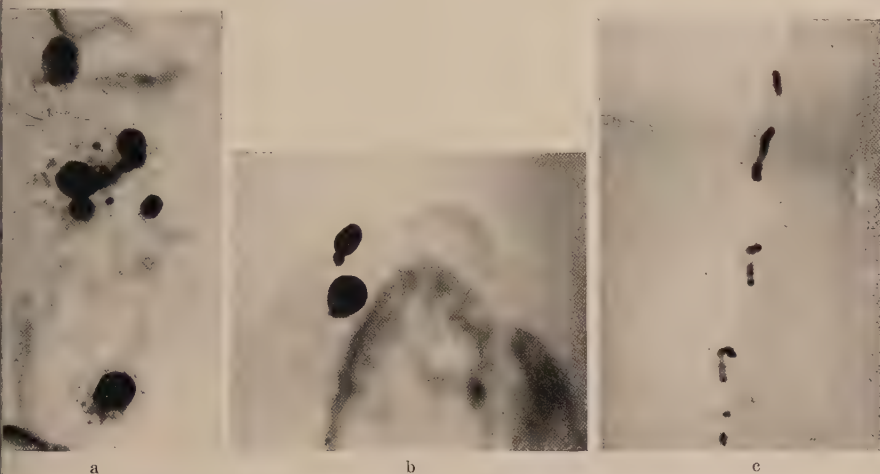


Abb. 5 a. Fruchtkörper von *Myxococcus rubescens* auf Asparagin-Agar. Vergr. 35 mal.
 5 b. Fruchtkörper von *Myxococcus rubescens* auf Glukose Calciumnitrat-Agar. Vergr. 35 mal.
 5 c. Fruchtkörper von *Myxococcus rubescens* auf Harnstoff-Agar. Vergr. 35 mal.

Ergeben sich also schon für die einfachsten Fruchtkörperformen, wie wir sie bei den *Myxococcaceen* finden, durch Variation der Außenbedingungen starke gestaltliche Veränderungen, so gilt dies noch mehr für die höchst differenzierten *Polyangiaceae*.

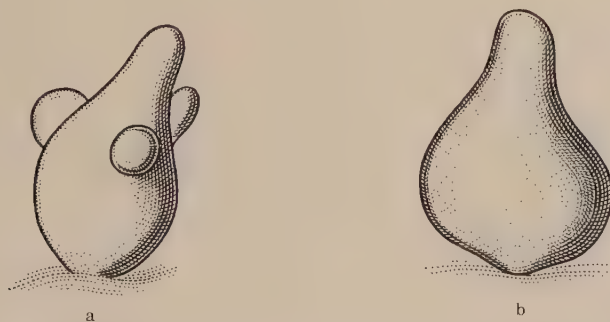


Abb. 6. Fruchtkörperformen von *Myxococcus rubescens* auf Calciumnitrat-Agar. Vergr. 175 mal.

Dabei ist besonders bemerkenswert, daß *Chondromyces crocatus* zuweilen auch die primitive Form des Fruchtkörpers der *Myxococcaceen* annimmt. Auf sterilisiertem Meerschweinchenmist fanden wir einmal einen *Chondromyces*, der aus einem Schleinklumpen direkt Zysten entwickelte (Abb. 7a), gleichzeitig auch dieselbe Form ohne Zystenbildung, wodurch sich eine starke gestaltliche Annäherung an

den Fruchtkörper von *Myrococcus rubescens* ergibt. In Mäusemistagarkulturen gingen Schwärme von *Chondromyces* vom Nährboden häufig an den Rand der Petrischale über und bildeten dort ganz auffallend dünne Cystophore (Abb. 7b), die zwar sehr deutliche Gelb-

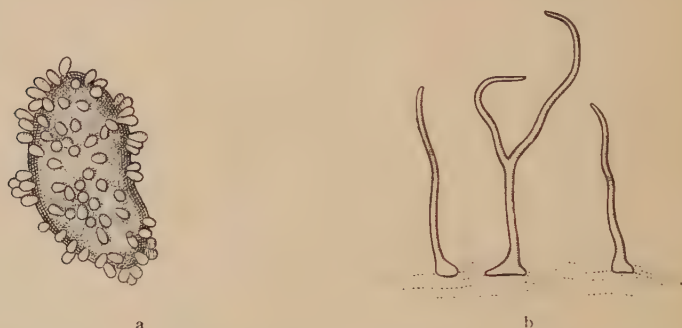


Abb. 7. *Chondromyces*fruchtkörperformen. a) auf Meerschweinchenmistagar. b) auf Mäusemistagar am Rande d. Petrischale. Vergr. a) 135 mal, b) 120 mal.

färbung zeigten, aber keinerlei Zysten entwickelten. Hier ist besonders offensichtlich, daß die plötzliche Veränderung des Nährmediums zu dieser abweichenden Form führte. Ebenfalls als Zeichen einer gewissen Abhängigkeit von Außenbedingungen sind Bildungen aufzufassen, wie wir sie in Kulturen auf Abb. 8 sehen.

Aus den fertig entwickelten Fruchtkörpern von *Chondromyces* sieht man neue, sehr viel kleinere und dünne, aber vollständig aus Cystophor und Zysten bestehende herauswachsen. Diese Erscheinung spricht nicht für eine besondere Stabilität der Zysten, die nach JAHN durch Verhärtung des Schleimes zustande kommen sollen. Hier haben die Stäbchen die Zystenhülle durchbrochen und sind zu neuer Fruchtkörperbildung geschritten. Dabei wurde der Inhalt der Zysten zur Sekundärbildung mit aufgebraucht.

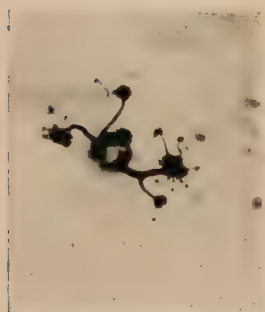


Abb. 8. Fruchtkörper von *Chondromyces crocatus* auf Mäusemistagar. Vergr. 40 mal.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß durch Variation der Außenbedingungen eine deutlich hervortretende formative Wirkung erzielt werden kann. Eine nicht zu unterschätzende Bedeutung kommt dabei auch dem Einfluß begleitender Mikroorganismen zu, was verschiedentlich in der Literatur (PINOY 1913, JAHN 1924) Erwähnung fand. Es bleibt zu untersuchen, welcher Art eine solche Beeinflussung ist, vor allem auch im Hinblick auf die Formen mit symbiontischem Charakter.

6. Die Myxobakterien als Einzelindividuen.

a) Beziehung zwischen Zellform und Bewegungsmechanismus.

Die *Myxobakterien* existieren als Einzelindividuen in zwei Formen, als Stäbchen und als Kokken. Die primitiven Formen der *Myxococcaceen* wechseln beim Übergang von der vegetativen in die fruktifikative Phase die Form, aus Stäbchen bilden sich Kokken. Bei den höher stehenden Arten verläuft die gesamte Entwicklung des einzelnen Individuums in der Stäbchenform. Letztere hat JAHN (1924) ausführlich beschrieben und erwähnt unter anderem, daß die langgestreckten Stäbchen eine gewisse Starrheit und Elastizität besitzen. Wir hatten wiederholt Gelegenheit, lebende Stäbchen zu beobachten und konnten besonders bei *Chondromyces* feststellen, daß stark gekrümmte Formen durchaus keine Seltenheit sind. Von einer völligen Starrheit kann keine Rede sein. Um so unverständlicher erscheint es, in diesem Zusammenhang auch noch von einer Elastizität zu sprechen. Die Tatsache einer starken Krümmungsfähigkeit paßt schlecht zur JAHNSchen Vorstellung vom Bewegungsmechanismus der Stäbchen, danach würde die Fortbewegung im wesentlichen nur durch die Absonderung von Schleim zustande kommen. Daß die Schleimabsonderung mit dem Bewegungsmechanismus in Zusammenhang steht, unterliegt kaum einem Zweifel. Wenn aber gleichzeitig Krümmungen der Stäbchen auftreten, die bis zu einer Berührung der beiden Polenden gehen können, so erscheint es nicht zweifelhaft, dieser Fähigkeit eine Bedeutung bei der Fortbewegung zuzuschreiben. Durch die Annahme von über die Stäbchen hinlaufenden Kontraktionswellen wäre auch eine aktive Bewegung durchaus möglich.

b) Kernäquivalente.

Die Angaben über das Vorhandensein eines Zellkernes oder von Kernäquivalenten sind sehr problematischer Natur. Seit der Feststellung THAXTERS (1897), daß in den Stäbchen Körner liegen, die unregelmäßig verteilt sind, haben wir keine wesentlich neuen Erkenntnisse mehr zu verzeichnen. Auch JAHN (1924) spricht nur von einer unregelmäßigen chromatischen Masse in der Längsachse der Stäbchen. Man könnte höchstens aus der im Innern der ruhenden Sporen von *Myxococcus* vorhandenen Substanzverteilung auf eine gewisse Übereinstimmung mit einem Zellkern schließen. Eingehender hat sich BADIAN (1930, 1933) mit der Zytologie der *Myxobakterien* beschäftigt. Er will für *Myxococcus virescens* und *Polyangium fuscum* nachgewiesen haben, daß das Chromatin an beiden Enden kugelig verdickte Chromosomen bildet, die sogar bei der Zellteilung einer Längsspaltung unterliegen und sich gleichmäßig auf die beiden Tochterzellen verteilen. Auch in einer zytologischen Untersuchung über das Chromatin und den Entwicklungszyklus der *Bakterien* zieht er Befunde an *Myxobakterien* vergleichsweise heran.

Eine photographische Abbildung zur „Chromatinreduktion bei *Bacillus subtilis*“ in der erwähnten Arbeit BADIANS veranlaßt uns, an der Chromosomennatur der betreffenden Gebilde ernstlich zu zweifeln. Wer sich eingehender mit der Zytologie des *Corynebacterium diphtheriae* beschäftigt hat, dem wird sich sicher ein Vergleich mit den Polkörperchen im Innern dieser Formen und den Zelleinschlüssen von *Bacillus subtilis* aufdrängen. Bekanntlich ist das Auftreten der Pol-

körperchen in *Corynebakterien* besonders deutlich in Kulturen auf Löffler-Serum. Wir haben auch *Myrococcus rubescens* auf diesem Substrat gezüchtet und wiederholt Ausstriche davon nach Neißer gefärbt, ohne eine typische Polkörperbildung festzustellen. Auch aus normalen Mistgarkulturen wurden Stäbchen von *Myrococcaceen* und *Chondromyces* nach Neißer und mit Löfflers Methylenblau angefärbt, ohne daß eine bestimmte Struktur im Zellinnern dabei festgestellt werden konnte. MILOVIDOV (1935) kommt auf Grund seiner Untersuchungen über *Myrobakterien* zu dem Schluß, daß die Thymonucleinsäure wahrscheinlich in den Körperchen, die den größten Teil der Zelle einnehmen, lokalisiert ist. Diese könnten vielleicht mit den Chromatinkörperchen, die in der *Myrobakterien*-Zelle mit anderen histologischen Methoden gefunden wurden, identisch sein.

7. Zur Frage der entwicklungsgeschichtlichen Stellung der *Myrobakterien*.

Die Stellung der *Myrobakterien* im System ist nach wie vor problematisch. Es ergeben sich Beziehungen zu den *Bakterien*, den *Cyanophyceen* und den *Myxomyceten*. THAXTER, der sich als erster mit den *Myrobakterien* beschäftigte (1892), stellt sie zu den *Bakterien*. Später wurden diese Organismen dann zu den *Myxomyceten* gerechnet (VAHLE 1909) und von manchen Forschern sogar als mit einem Hyphenpilz in Symbiose lebende Stäbchen bezeichnet. Nach JAHN (1924), der sich mit diesem Problem ausführlicher auseinandersetzte, kommen als Verwandte der *Myrobakterien* nur die *Cyanophyceen* ernstlich in Betracht.

Im Verlaufe unserer Untersuchungen hatten wir Gelegenheit, uns ebenfalls mit der Frage der verwandtschaftlichen Beziehungen der *Myrobakterien* zu beschäftigen. Am allerwenigsten wären wir dabei auf den Gedanken gekommen, die *Myrobakterien* als apochlorotische *Cyanophyceen* zu bezeichnen, die nach dem Übergang zur saprophytischen Lebensweise die übrigen Farbstoffe verloren, das Karotin aber, das wegen seiner Oxydationsfähigkeit wohl auch bei Stoffwechselvorgängen außerhalb der Assimilation von Bedeutung ist, beibehalten, ähnlich wie ja auch manche *Oscillarien* ein Überwiegen der roten Farbstoffe zeigen. Auch das Übereinstimmen in der Bewegungsweise ist von JAHN als besonders wesentlich hervorgehoben worden.

Dem unvoreingenommenen Beobachter drängen sich aber zweifellos andere Gesichtspunkte auf, die viel naheliegender und im Formproblem begründet sind, das KÜHN (1943) als ein Grundproblem der Biologie bezeichnet. Die *Myrobakterien* sind ein Musterbeispiel dafür, wie sich die Formbildung an einer Vielheit vollkommen gleichartiger Zellen vollzieht.

Die Einzelindividuen, Stäbchen oder Kokken, werden aus dem Fruchtkörper entlassen und gehen zunächst in eine vegetative Phase ein. Diese ist gekennzeichnet durch starke Vermehrung der Stäbchen, worauf es zur Schwarmbildung kommt. Der Schwarm ist also eine Anhäufung beziehungslos zueinanderstehender stäbchenförmiger Einzel-

individuen. Sobald nun auf diese Masse von einander unabhängiger Zellen ein Reiz ausgeübt wird, entstehen Bildungszentren der Fruchtkörper; in oder am Rande des Schwarmes häufen sich die Stäbchen, indem sie dabei in Kokkenform übergehen, zu einem kleinen Kegel, der auf die umliegenden Einzelindividuen anziehend wirkt und ein fortwährendes Hinströmen zu diesem Sammelzentrum bewirkt. Im einfachsten Fall gehen aus diesen Ansammlungen Fruchtkörper hervor, wie wir sie unter den *Myxococcaceen* finden. Bei den höchstentwickelten *Chondromycetaceae* entstehen ohne Formveränderung der Einzelindividuen in Cystophor und Zysten gegliederte Fruchtkörper.

Wir haben versucht, die verschiedenen Entwicklungsrichtungen innerhalb der *Myxobakterien* in einem Schema darzustellen (Abb. 9).

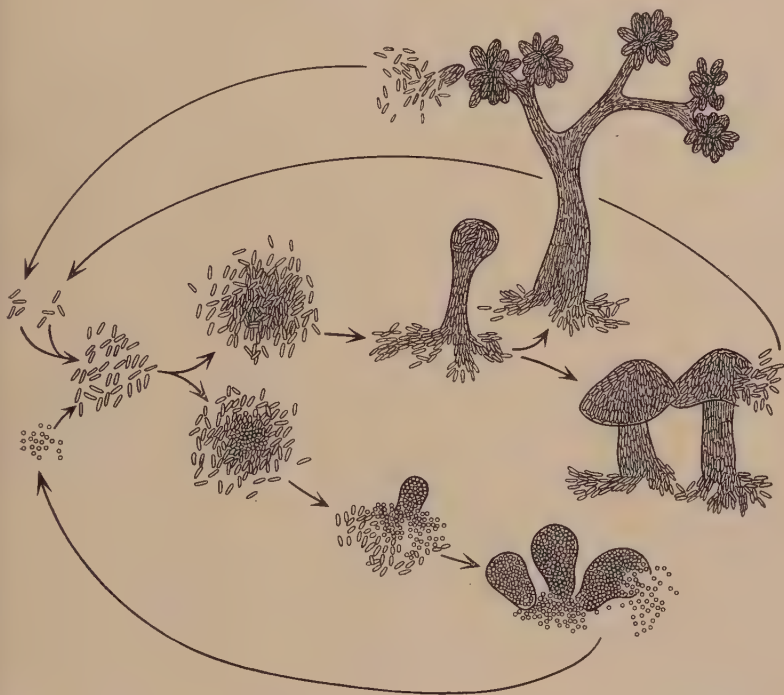


Abb. 9. Schema des Entwicklungsganges verschiedener *Myxobakterien*: Vom vegetativen Stadium (Schwarm, links) über Beginn der fruktifikativen Phase und beginnende Differenzierung der Fruchtkörper bis zum Abschluß der fruktifikativen Phase (rechts, *Chondromyces* oben, *Melittangium* Mitte, *Chondromyces* unten). Veget. Stadien etwa 250 mal, fruktifikative Stadien etwa 40 mal.

Darin tritt das Prinzip der Formbildung in aller Deutlichkeit hervor, wobei wir von *Myxococcus* als einfachstem Typ über *Melittangium* bis zu *Chondromyces* eine fortlaufende morphologische Differenzierung erkennen können. Die entwicklungsgeschichtlichen Beziehungen, die sich hieraus ergeben, weisen uns den Weg zu den *Myromyceten*, den

Schleimpilzen. Diese besitzen in den einfachsten Vertretern, den *Acrasieen*, Formen, die eine direkte Fortsetzung des Gestaltungsprinzips der *Myxobakterien* darstellen. *Dictyostelium mucoroides*, ein *Myxomycet*, der schon im Zusammenhang mit der Symbiose bei *Chondromyces* Erwähnung fand, soll als Beispiel angeführt werden.

Der gestielte Fruchtkörper entläßt Sporen, aus denen einkernige Amöben schlüpfen. Die Amöben wandern mit Pseudopodien umher und vermehren sich sehr stark. Während dieses Stadiums bleiben sie beziehungslos voneinander getrennt. Substratveränderungen wirken reizauslösend, es werden Amöbenansammlungen gebildet und diesen Sammelzentren streben die umliegenden Amöben unter gleichzeitiger

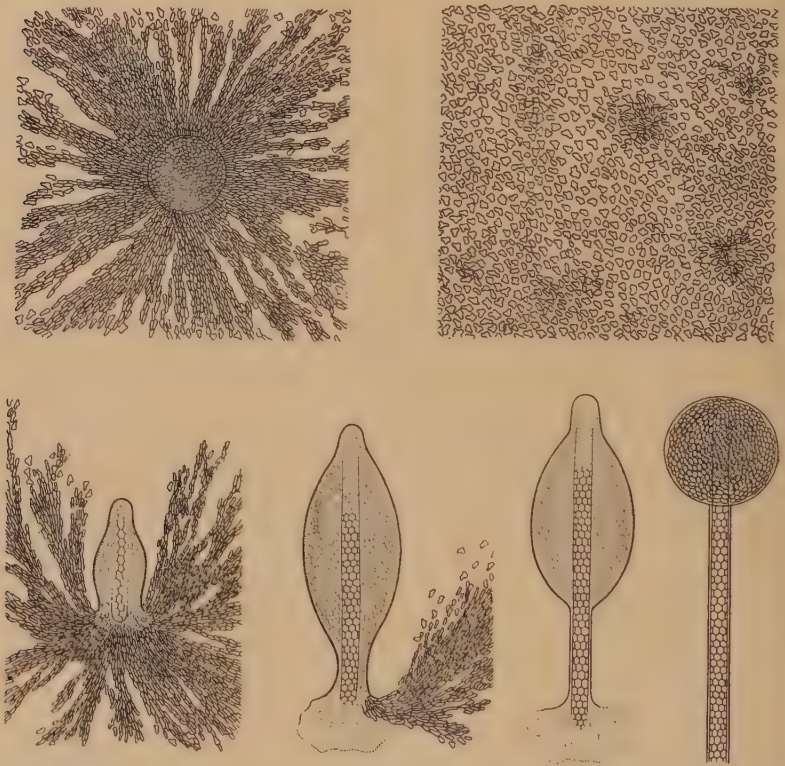


Abb. 10. Schema des Entwicklungsganges von *Dictyostelium mucoroides* von dem Stadium der beziehungslosen Amöben bis zum Sporenträger. (Nach KÜHN 1943). Vergrößerung vom Autor nicht angegeben. Veget. Stadien etwa 100 mal, fruktifik. Stadien etwa 30 mal.

Formveränderung zu. Es bildet sich ein Hügel, aus dem sich eine Achse differenziert, die aus dicht aneinander gelagerten Amöben besteht. An dieser Achse wandern die Amöben aufwärts, und wenn alle aus dem Zuzugsgebiet die Spitze erreicht haben, bildet sich eine Kugel, in deren Innern die einzelnen Amöben zu Sporen werden (vergleiche Abb. 10).

Das einheitliche Formprinzip ergibt sich aus einem Vergleich der Abbildungen 9 und 10. Hier kann es sich nicht um eine bloße Konvergenzerscheinung handeln. Aus einer „typischen Reaktionsnorm der Amöbenzelle“ (KÜHN 1943) oder der *Myxobakterien*-Zelle ergibt sich ein Ganzes. Wir bestreiten nicht, daß das vegetative Leben ebenso wie die fruktifikative Periode weitgehend im Zeichen der Konvergenz stehen. Es ist aber abwegig zu sagen, Einrichtungen für die Ausstreuung von Zysten oder Sporen kämen in ganz ähnlicher Form bei Organismen der heterogensten Verwandtschaft vor, um damit den Verdacht verwandtschaftlicher Beziehungen zwischen *Myxobakterien* und *Myxomyceten* zu zerstreuen. In unserem Fall handelt es sich doch um ein einheitliches Gestaltungsprinzip, das in der vegetativen und fruktifikativen Phase der Entwicklung zweier nahestehender Organismen zum Ausdruck kommt. Wollten wir etwa aus der Übereinstimmung in der Bewegungsweise der *Myxobakterien* und *Cyanophyceen* eine größere verwandtschaftliche Beziehung herleiten? Und wo käme sonst auf dieser Entwicklungsstufe ein so hohes morphologisches Gestaltungsvermögen zur Geltung, als bei *Myxobakterien* und *Myxomyceten*?

Von der formvergleichenden Feststellung einer Verwandtschaftsbeziehung zur phylogenetischen Hypothese ist freilich noch ein entscheidender Schritt. Stammesgeschichtliche Ableitung behauptet ein zeitliches Vorhergehen und Aufeinanderfolgen, das nur durch paläontologische Feststellungen bewiesen, bzw. wahrscheinlich gemacht werden kann. Für die ersten Formen der *Bakterien* und *Pilze* geben uns aber die paläontologischen Funde, die überdies in der Deutung recht unsicher sind, noch keinerlei sichere Auskunft; von dem ersten Auftreten der *Myxomyceten* und *Myxobakterien* wissen wir überhaupt nichts. Für das Verhältnis der *Myxomyceten* und *Myxobakterien* ist die zeitliche Richtung der Ableitung einstweilen ebenso unsicher wie für das Verhältnis der übrigen *Bakterien*-Gruppen zu den niedrigsten *Phycomyceten*-Gruppen oder zu *Cyanophyceen*.

Es liegt hier zweifellos ein entwicklungsgeschichtliches Problem vor, das auf eine verwandtschaftliche Beziehung von *Myxobakterien* und *Myxomyceten* in obigem Sinn hinweist. Eine Klärung kann vielleicht aus der Erweiterung unserer Kenntnisse auf zytologischem und stoffwechselphysiologischem Gebiet erwartet werden.

Zusammenfassung.

Die problematische Stellung der *Myxobakterien* im System gab Veranlassung, die Biologie und Entwicklungsgeschichte derselben eingehender zu untersuchen.

Die in der Literatur mehrfach aufgeworfene Frage nach der Primärentwicklung der *Myxobakterien* wurde erneut gestellt und der Beweis erbracht, daß es sich um Mikroorganismen des Bodens handelt.

Es wurde nachgewiesen, daß die *Myrobakterien* in der Hauptsache mit dem Mist bestimmter Pflanzen- bzw. Allesfresser direkt übertragen werden.

Die gefundenen Formen wurden systematisch zusammengestellt und *Myxococcus digitatus* als neue Spezies beschrieben.

Auf Grund der gewonnenen Einsichten in die Systematik wird eine Änderung derselben vorgeschlagen, dahingehend, die *Myrobakterien* in 2 Gruppen, die *Myxococcaceae* und die *Chondromycetaceae*, zu gliedern.

Mistagarnährböden bestimmter Zusammensetzung sowie Erdextrakt-agar erwiesen sich als günstige Kulturmedien für *Myxococcus rubescens*, *Myxococcus virescens* und *Polyangium fuscum*, genügten dagegen nicht für Reinkulturen von *Chondromyces crocatus*.

Stoffwechselversuche erstreckten sich auf die Prüfung der Verwertbarkeit von Kohlenhydrat- und Stickstoffquellen. *Myxococcus rubescens* zeigte ein gutes Verwertungsvermögen gegenüber den meisten Kohlenhydraten. *Myxococcus virescens* und *Polyangium fuscum* ließen auf den geprüften C-Nährböden meist nur eine schwächere vegetative Entwicklung erkennen. Zellulose wird von *Myxococcus rubescens* nicht als C-Quelle benützt.

C-N-Nährböden waren für *Myxococcus rubescens* in den meisten Fällen recht brauchbar. Dabei erwies sich auch Laevulose, die allein schlecht ausgenutzt wird, als geeignet. Die günstige nutritive Wirkung von Glykose wird in Gegenwart von Ammonnitrat abgeschwächt. Maltose scheint in Verbindung mit organischem Stickstoff besser verwertet zu werden.

An höheren Eiweißverbindungen zeigte unter anderem Löffler-Serum gute Verwertbarkeit, wobei eine starke formative Wirkung sichtbar wurde.

Chondromyces crocatus konnte in Reinkultur nicht gezüchtet werden. Es gelang nachzuweisen, daß es sich um eine symbiontische Form handelt.

Die starke Abhängigkeit der Fruchtkörperform vom Substrat wird an Hand typischer Beispiele gezeigt.

Die Frage der entwicklungsgeschichtlichen Stellung der *Myrobakterien* wird eingehend erörtert. Der JAHNSche Standpunkt, die *Myrobakterien* als apochlorotische *Cyanophyceen* zu bezeichnen, wird zu widerlegen versucht.

Es wird eine im Formproblem begründete Entwicklung erörtert und in einem Schema die Entwicklungsrichtung dargelegt.

Literatur.

ARNDT, A.: Rhizopodienstudien III. Untersuchungen über Dictyostelium mucoroides. Arch. Roux. **136** (1937).

BADIAN, J.: Zur Zytologie der Myxobakterien. Acta. Sec. Bot. Polon. **7** 55 (1930). — BADIAN, J.: Eine zytologische Untersuchung über die Myxobakterie Polyangium fuscum. Ebenda **10**, 361 (1933). — BADIAN, J.: Eine

zytologische Untersuchung über das Chromatin und den Entwicklungszyklus der Bakterien. Arch. f. Mikrobiol. **4**, 409 (1933). — BAUR, E.: Myxobakterienstudien. Arch. Protistenkunde. **5**, 42 (1904). — BOKOR, R.: Myxococcus cytophagus n. sp. (Zytophaga Hutschinson and Clayton 1919). Unters. üb. aerobe bakterielle Zellulosezersetzung mit besonderer Berücksichtigung des Waldbodens. Arch. f. Mikrobiol. **1**, 1 (1930).

EMOTO, YOSHIKADZU: Eine Liste der Literatur der Myxobakterien. The Bot. Mag. **63**, Tokio (1929).

FÄHRREUS, G.: Wirkung von Glukose auf die Zellulosezersetzung einiger Cytophaga-Arten. Cbl. Bakt. II, **104**, 264 (1941). — FAULL, I. H.: Chondromyces Thaxteri a new Myxobacterium. Bot. Gaz. **62**, 226 (1916). — FUNK, G.: Über Bewegungen der Kolonien von Oscillaria amphibia Ag. Beiträge zu einer soziologischen Bewegungsphysiologie pflanzlicher Mikroorganismen. Beih. Bot. Centrbl. **39**, Abt. I, 257 (1923).

HARDER, R.: Über die Bewegung der Nostocaceen. Zeitschr. f. Bot. **10**, 177 (1918).

IMSCHENETZKI, H. A.: Über die toxische Wirkung der Glukose auf Myxobakterien. Mikrobiol. **10**, 179 (1941) (Russ.).

JAHN, E.: Beiträge zur botanischen Protistologie. I. Die Polyangiden. Bornträger Leipzig (1924). — JAHN, E.: Kulturmethode und Stoffwechseluntersuchungen bei Myxobakterien (Polyangiden). Abderhalden. Hdb. Abt. XII., T. 2. H. 6 (1936).

KOFLEK, L.: Die Myxobakterien der Umgebung von Wien. Sitz. Ber. K. Ak. d. Wiss. Math. Naturw. Abt. I, **122**, 845 (1913). — KRZEMIENIEWSKI, H. und SEW.: Die Myxobakterien von Polen. Ac. Soc. Bot. Polon. **4**, 1 (1926). — KRZEMIENIEWSKI, H. und SEW.: Die Myxobakterien von Polen. Ebenda **7**, 250 (1930). — KRZEMIENIEWSKA, H.: Contribution à l'Etude du Genre Cytophaga. Winogradsky, Arch. f. Mikrobiol. **4**, 394 (1933). — KÜHN, A.: Die Ausprägung organischer Formen in verschiedenen Dimensionen und die Grundfragen der Entwicklungsphysiologie. Die Naturwissensch. **31**, 373 (1943).

LIESKE, R.: Kurzes Lehrbuch der allgemeinen Bakterienkunde. Bornträger Berlin (1926).

MILÓVIDOV, P. F.: Ergebnisse der Nuclealfärbung bei den Myxobakterien und einigen anderen Bakterien. Arch. f. Mikrobiol. **6**, 475 (1935).

PINOY, M. E.: Sur la nécessité d'une association bactérienne d'une Myxobactérie Chondromyces crocatus. Ann. Inst. Past. **35**, 487. (1921).

RIPPEL, A. u. FLEHMIG, H.: Untersuchungen über den aeroben Cellulosezer-setzer Itersonia ferruginia. Arch. f. Mikrobiol. **4**, 229 (1933). — RIPPEL, A. u. WITTER, P.: Untersuchungen an Actinomycceten. Ebenda **5**, 24 (1934).

QUEHL, A.: Untersuchungen über die Myxobakterien. Zentrbl. f. Bakt. II, **16**, 9 (1906).

SABOURAUD: Les Teignes (1910). — SCHMID, G.: Das Reizverhalten künstlicher Teilstücke, die Kontraktilität und das osmotische Verhalten der Oscillatoria jenensis. Jahrb. wiss. Bot. **62**, 328 (1923). — SOLNTZEWA, L.: Biologie der Myxobakterien II. Melittangium und Chondromyces. Mikrobiol.

10, 505 (1941) (Russ.). Ref. Zentrbl. f. Bakt. **105**, 270 (1942). — STANIER, R. Y.: Studies on the Cytophagas. Journ. Bact. **40**, 619 (1940). — STANIER, R. Y.: A Note on Elastotaxis in Myxobacteria. Journ. B. **44**, 405 (1942). — STANIER, R. Y.: The Cytophaga Group: A Contribution to the Biology of Myxobacteria. Bact. Rev. **6**, 143 (1942). — STANIER, R. Y.: Studies on nonfruiting Myxobacteria. Journ. of Bact. **53**, 297 (1947).

THAXTER, R.: On the Myxobacteriaceae, a new order of the Schizomycetes. Bot. Gaz. **17**, 389 (1892). — THAXTER, R.: Further observations on Myxobacteriaceae. Ebenda **23**, 315 (1897). — THAXTER, R.: Notes on the Myxobacteriaceae. Ebenda **27**, 405 (1904).

VAHLE, C.: Vergleichende Untersuchungen über die Myxobakterien und Bakteriaceen, sowie die Rhodobakteriaceen und Spirillaceen. Zentrbl. f. Bakt. II, **25**, 178 (1909).

ZEDERBAUER, E.: Myxobacteriaceae, eine Symbiose zwischen Pilzen und Bakterien. Sitz. Ber. k. Ak. d. Wiss. Wien. Math. Naturw. Kl. **112**, 1 (1903). —

ZUKAL, H.: Myxobotrys variabilis als Repräsentant einer neuen Myxomycetengattung. Ber. d. deutsch. Bot. Ges. **14**, 340 (1896). — ZUKAL, H.: Über die Myxobakterien. Ebenda **15**, 17 (1897).

Keimung verschieden alter Konidien von *Aspergillus niger* und Wachstum aus ihnen gezogener Mycelien.

Von

MAX ROBERG, Hohenlimburg

unter Mitarbeit von

GEORG KIERA, Karlsruhe.

Mit 7 Textabbildungen.

(Eingegangen am 20. Dezember 1948¹.)

Mit der Frage, welches Alter *Aspergillus*-Rassen, insbesondere ihre Konidien, erreichen können, haben sich eine Reihe von Forschern befaßt, die zu unterschiedlichen Auffassungen gelangten. Teils wurden im Zuge anderer Versuche Beobachtungen dieser Art nur nebenbei gemacht, und die Ergebnisse erscheinen dann oft an versteckter Stelle im Schrifttum, teils wurden sie aber auch durch systematisches Studium gewonnen. So beobachtete BREFELD Keimung 6 Jahre alter Konidien von *Aspergillus flavus*, EIDAM Keimung 10 Jahre alter von *Asp. fumigatus* und HANSEN eine solche 16jähriger Sporen von *Asp. glaucus*. Diese Ergebnisse konnte jedoch WEHMER bei den von ihm kultivierten Pilzen nur teilweise bestätigen; so waren die Konidien von *Asp. fumigatus* nach 6 Jahren und von *Asp. glaucus* bereits nach 1—2 Jahren abgestorben, allein von *Asp. flavus* erreichte ein Teil der Sporen ein höheres Alter und war nach 6 Jahren noch lebend. Nun begann man, in die Befunde der früheren Autoren gewisse Zweifel zu setzen, zu Unrecht allerdings, wie kürzlich ROBERG (1948) gezeigt hat, der 10—15 Jahre alte, eingetrocknete Kulturen von 14 *Aspergillus*-Arten, die in insgesamt 24 Rassen vorlagen, auf ihren Lebenszustand prüfte. Durch Sporenabimpfung konnten von 11 Arten neue Kulturen angelegt werden, nur 3 erwiesen sich als abgestorben². Die maximale Lebensdauer vieler *Aspergillus*-Arten ist somit höher, als man gemeinhin anzunehmen gewohnt war, sie hängt aber, wie WEHMER bereits betonte und ROBERG ausführlicher darlegte, „entscheidend von der vorliegenden Rasse ab, da die Fähigkeit, ein hohes Alter zu erreichen, neben einer Art- in erster Linie eine Rasse-eigentümlichkeit darstellen dürfte“.

¹ Die Untersuchungen wurden 1943/44 in der pharmakognostischen Abteilung der Botanischen Anstalten Breslau durchgeführt.

² Infolge eines Versehens geriet in der oben zitierten Veröffentlichung von ROBERG auf S. 3 bei der Aufzählung der abgestorbenen *Aspergillus*-Arten die folgende Zeile in Verlust:

Aspergillus flavipes ... Alter der Kultur: 12 Jahre.

³ MCCREA berichtete sogar über 22 Jahre alte keimfähige Konidien von *Asp. Oryzae*. U. W. ist dies das bisher höchste einwandfrei nachgewiesene Alter lebender *Aspergillus*-Konidien.

Bei einem vergleichenden Keimversuch des letztgenannten Autors mit den alten und den neu erhaltenen, jungen Sporen zeigte sich jedoch, daß, in Übereinstimmung mit einigen Angaben im Schrifttum, das Auftreten des Mycels nach Beimpfung mit alten Konidien verzögert war gegenüber dem Erscheinen des Mycels nach Aussaat junger Konidien, sich demnach die verschiedenen alten Sporen in dieser Hinsicht unterschieden. ROBERG nahm nun an, daß die *Keimung der alten Konidien verzögert* und so das spätere Erscheinen der Pilzrasen zu erklären sei. Der Unterschied in der Keimzeit zwischen alten und jungen Sporen betrug bei den zu unseren, weiter unten beschriebenen Untersuchungen benutzten Rassen von *Asp. niger* bei einer Versuchstemperatur von 34° C 1 Tag. War das erste sichtbare Wachstum der alten Konidien nach 2 Tagen zu beobachten, so trat das der jungen schon nach 1 Tag ein. Hatte Wachstum eingesetzt, konnte nach äußerlicher Betrachtung kein weiterer Unterschied mehr beobachtet werden; sowohl Mycelwachstum wie Konidienfruktifikation verliefen normal.

Aber gerade der beobachtete Unterschied in dem zeitlichen Auftreten des Mycels nach Beimpfung mit verschiedenen alten Konidien warf eine Reihe von Problemen auf. So interessierte zunächst, wie *verschiedene Temperaturen* einwirkten, weiter, ob sich wirklich die gebildeten Mycelien in ihrer *Entwicklung* gleichartig verhielten, z. B. in der Wachstumsgeschwindigkeit, ihrem Gewicht usw. Dann tauchte die wohl interessanteste Frage auf, worauf die *Verzögerung in der Keimzeit* der alten Konidien beruhte.

Das vorhandene Kulturmaterial ließ eine erfolgversprechende Bearbeitung obiger Probleme erwarten, und so wandten wir uns diesen Versuchen zu. Infolge Kriegseinwirkung konnten sie allerdings nicht in dem zunächst geplanten Maße durchgeführt werden. Da aber eine Wiederaufnahme der Untersuchungen wegen des Fehlens der Originalkulturen, die im Breslauer Institut verblieben und so in Verlust geraten sind, unmöglich ist, sei im folgenden über die bereits erhaltenen Ergebnisse berichtet.

Versuchsmaterial.

Herangezogen wurden zu den Untersuchungen 5 von ROBERG seinerzeit benutzte Rassen von *Aspergillus niger* van Tieghem: *Fulda*, *Göttingen neu*, *Münster I*, *Münster II* und *Zwetsche*, Rassen, die von BEHR und ROBERG isoliert und schon verschiedentlich zu Untersuchungen verwandt waren. Die Pilze befanden sich in Reagensgläsern mit Watteverschluß auf eingetrockneten, festen Nährböden. Die Kultur der Rasse *Göttingen neu* war im Frühjahr 1932, die Kulturen der anderen Rassen waren im Frühjahr 1931 angelegt worden; sie wurden die ganze Zeit über bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Verunreinigungen ließen sich nicht nachweisen.

Die Anzucht der für die Versuche benötigten jungen Konidien erfolgte auf Kartoffelschnitzeln in Reagensgläsern mit Watteverschluß, die im Autoklaven sterilisiert waren. Diese Nährböden wurden mit Konidien der alten Kulturen beimpft und bei 34° gehalten. 5—7 Tage nach der Aussaat kamen die neu gebildeten, jungen Sporen zur Benutzung. Da die Mycelien ca.

2—4 Tage nach der Beimpfung des Nährbodens mit der Konidienfruktifikation begannen, ist das Alter der jungen Konidien 1—5 Tage, während das der alten demgegenüber 11—13 Jahre beträgt. *In der Folge wird dieses Konidienmaterial jung bzw. alt genannt werden.* Außerdem wurden für verschiedene Versuche noch Konidien benutzt von Kulturen, die 12 Monate vorher aus Sporen der alten Stammkulturen gezogen und bei Zimmertemperatur aufbewahrt waren. Das Konidienmaterial hatte also folgendes Alter:

- | | | |
|-------------------|---|---------------------------|
| 1. Stammkultur | < | 2. Kultur = 12 Monate alt |
| (11—13 Jahre alt) | | 3. Kultur = 5—7 Tage alt |

Keimung, Wachstum und Konidienbildung bei verschiedener Temperatur.

Wie eingangs erwähnt, beobachtete ROBERG, daß das Auftreten des Mycels nach Beimpfung eines Nährmediums mit alten Konidien bei 34° verzögert war gegenüber dem Erscheinen des Mycels nach Beimpfung mit jungen Konidien. Schon früher hatte WEHMER festgestellt, daß 6 Jahre alte Sporen später keimten als junge, ihre Keimzeit mit zunehmendem Alter wuchs, und bei ZOBL keimten 2½jährige Sporen nur noch sehr träge.

Unsere erste Versuchsreihe beschäftigte sich ebenfalls mit diesem Problem, sie sollte in erster Linie den *Temperaturfaktor* als variierende äußere Bedingung berücksichtigen; ferner sollte die *Stärke des Mycelwachstums* und das *zeitliche Auftreten der Konidienfruktifikation* beobachtet werden, von denen ROBERG nur berichtet hatte, daß ihre Ausbildung normal verlaufen sei. Ohne Versuche war nicht zu entscheiden, ob sich ungünstige Temperaturen — hohe wie niedere — auf Keimung und Sporulation unseres wärmeliebenden Pilzes gleichmäßig auswirken würden, oder ob etwa die alten Konidien infolge ihres Alters bereits geschädigt waren und daher nur noch bei günstigen Temperaturen keimen und Pilzrasen bilden konnten.

Alte, 12 Monate alte und junge Konidien wurden auf sterile, in Reagensgläsern mit Watteverschluß befindliche Kartoffelschnitzel gebracht und bei 11 verschiedenen, von 4—54° C ansteigenden, jedesmal 5° auseinander liegenden Temperaturen aufbewahrt. Die Temperaturen um 4—19° schwankten leicht, während die übrigen konstant gehalten wurden. Irgendein Fehler konnte sich hierdurch nicht einschleichen, da *sämtliche Kulturen gleichzeitig* angesetzt wurden. Um ein Austrocknen der Nährböden während der Versuchszeit bei den höheren Temperaturen von 44—54° zu verhindern und gleichzeitig die für eine Keimung erforderliche Luftfeuchtigkeit zu gewährleisten, wurden die beimpften Reagensgläser in eine feuchte Kammer gebracht und diese in den Wärmeschränk gestellt. Die Kulturen wurden alle 12 Stunden mit einer Lupe auf Wachstum und Konidienbildung untersucht. Versuchsdauer: 4 Wochen.

Die Ergebnisse, die eine Bestätigung der Befunde von ROBERG bedeuten, sind aus der Tabelle I und den Abbildungen 1 und 2, graphischen Darstellungen einiger Werte der Tabelle, zu ersehen. Da die 12 Monate alten Konidien sich wie die jungen verhielten, wurden sie in den Tabellen nicht mitaufgeführt.

Tabelle I. *Keimung alter und junger Konidien einiger Aspergillus niger-Rassen, sowie Wachstum und Konidienbildung aus ihnen gezogener Mycelien bei verschiedenen Temperaturen.*

Rasse	Entwicklung	Konidien	Versuchstemperatur in °C							
			9	14	19	24	29	34	39	44
Fulda	Mycel sichtbar nach Tagen Verzögerungsfaktor*)	alt	—	14	5	3	2,5	2	1,5	—
		jung	—	3	1,5	1	0,5	0,5	0,5	3
		alt		4,7	3,3	3	5	4	3	
	Wachstum	alt	—	III	I	I	I	I	I	—
		jung	—	II	I	I	I	I	I	III
	Beginn der Konidienbildung in Tagen nach dem Auftreten des Mycels	alt	—	4	1	1	0,5	0,5	1	—
		jung	—	5	2	1,5	2,5	0,5	1	1,5
	Stärke der Konidienbildung	alt	—	III	I	I	I	I	—	—
		jung	—	II	I	I	I	I	III	—
Göttingen neu	Mycel sichtbar nach Tagen Verzögerungsfaktor	alt	—	10	3	2	1,5	1	1	2
		jung	—	3	1,5	1	0,5	0,5	0,5	1
		alt		3,3	2	2	3	2	2	2
	Wachstum	alt	—	III	I	I	I	I	I	III
		jung	—	II	I	I	I	I	I	III
	Beginn der Konidienbildung in Tagen nach dem Auftreten des Mycels	alt	—	3	1	1	0,5	0,5	0,5	3
		jung	—	6	1,5	1	1	0,5	0,5	1
	Stärke der Konidienbildung	alt	—	III	I	I	I	I	I	III
		jung	—	III	I	I	I	I	I	III
Münster I	Mycel sichtbar nach Tagen Verzögerungsfaktor	alt	—	10	3,5	2,5	1,5	1	1,5	2,5
		jung	20	3	1	1	1	0,5	0,5	1
		alt		3,3	3,5	2,5	1,5	2	3	2,5
	Wachstum	alt	—	I	I	I	I	I	I	III
		jung	III	I	I	I	I	I	I	III
	Beginn der Konidienbildung in Tagen nach dem Auftreten des Mycels	alt	—	2	1,5	0,5	0,5	1	0,5	1
		jung	—	5	2	1	0,5	1	0,5	3
	Stärke der Konidienbildung	alt	—	I	I	I	I	I	I	III
		jung	—	I	II	II	II	I	I	III

Zeichenerklärung: — = kein Mycelwachstum bzw. keine Konidienbildung

I = starkes, II = mittelmäßiges, III = schwaches Mycelwachstum bzw. Auftreten von Konidien.

*) Verzögerung der Keimung alter Konidien gegenüber der Keimung junger Konidien.

Tabelle I. (Fortsetzung.)

Rasse	Entwicklung	Konidien	Versuchstemperatur in ° C							
			9	14	19	24	29	34	39	44
Münster II	Mycel sichtbar nach Tagen	alt	—	9	3	2,5	1,5	1	1	1,5
		jung	15	2	1	1	0,5	0,5	0,5	1
	Verzögerungsfaktor	alt		4,5	3	2,5	3	2	2	1,5
	Wachstum	alt	—	II	I	I	I	I	I	III
		jung	III	I	I	I	I	I	I	II
Zweitsche	Beginn der Konidienbildung in Tagen nach dem Auftreten des Mycels	alt	—	3	1	0,5	0,5	0,5	1	2,5
		jung	—	5	1,5	1	1	0,5	0,5	1,5
	Stärke der Konidienbildung	alt	—	I	I	II	II	I	I	III
		jung	—	I	I	II	II	I	I	II
	Mycel sichtbar nach Tagen	alt	—	12	3	2,5	1,5	1	1	1,5
Durchschnitt		jung	—	3	1,5	1	0,5	0,5	0,5	1
	Verzögerungsfaktor	alt		4	2	2,5	3	2	2	1,5
	Wachstum	alt	—	III	I	I	I	I	I	III
		jung	—	II	I	I	I	1	I	II
	Beginn der Konidienbildung in Tagen nach dem Auftreten des Mycels	alt	—	3	1	1	1	1	1	1
		jung	—	6	1,5	1	1	1	1	1
	Stärke der Konidienbildung	alt	—	II	I	I	I	I	I	III
		jung	—	II	I	I	I	I	I	III
	Mycel sichtbar nach Tagen	alt	—	11	3,5	2,5	1,7	1,3	1,2	1,9
		jung	—	2,8	1,3	1,0	0,6	0,5	0,5	1,0
	Verzögerungsfaktor	alt		3,9	2,7	2,5	2,8	2,6	2,4	1,9
	Beginn der Konidienbildung in Tagen nach dem Auftreten des Mycels	alt	—	3,0	1,2	0,9	0,6	0,7	0,8	1,5
		jung	—	5,4	1,5	1,0	1,0	0,6	0,7	1,3

Bei den Temperaturen von 4, 49 und 54° trat innerhalb von 4 Wochen kein Wachstum ein. Ob sich nach Verlängerung der Versuchszeit noch Entwicklung gezeigt haben würde, möge im Hinblick auf HEINTZELER, die bei *Penicillium glaucum* Keimzeiten von über 9 Wochen fand, dahingestellt bleiben. Da nun WEHMER beobachtet hatte, daß Sporenaussaaten, die ungünstiger Temperaturverhältnisse wegen nicht gekeimt waren, alsbald Entwicklung zeigten, wenn sie günstigeren Temperaturen ausgesetzt wurden, kamen die obigen, beimpften Kulturröhrchen nach 4 Wochen in einen auf 34° eingestellten Thermostaten. Es trat zu-

nächst Mycelentwicklung der jungen, später der alten Konidien ein, und die Kulturen machten den Eindruck, als seien die Nährböden frisch beimpft und nicht bereits längere Zeit bei ungünstigen Temperaturen

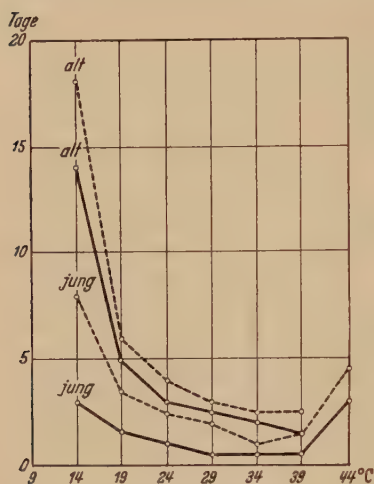
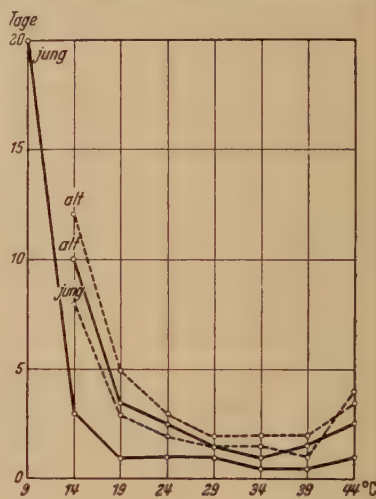
Abb. 1. *Asp. niger* Rasse Fulda.Abb. 2. *Asp. niger* Rasse Münster I.

Abb. 1 u. 2. Keimung alter und junger Konidien von *Asp. niger* Rasse Fulda und Münster I, sowie Beginn der Konidienbildung der aus ihnen gezogenen Mycelien bei verschiedenen Temperaturen. ——— = Keimung; — — — = Beginn der Konidienbildung.

aufbewahrt worden. Dieser Befund verdient Beachtung im Hinblick auf weiter unten beschriebene Versuche, durch besondere Vorbehandlung den Unterschied in der Keimungszeit der verschiedenen alten Konidien zu beeinflussen.

Bis auf geringfügige, wohl durch die Rasse bedingte Unterschiede, verhielten sich alle Pilze gleich. Bei allen Temperaturen, die Auskeimen der Konidien und Weiterwachstum des Mycels gestatteten, war eine Keimungsverzögerung der alten gegenüber den jungen Sporen zu bemerken, wobei die Verzögerungszeit, wie die Tabelle zeigt, das 1.9—3.9, im Durchschnitt das 2.7fache betrug. Bei der für unseren Pilz tiefen Temperatur von 14° war der Verzögerungsfaktor der Keimung bei den alten Konidien mit 3.9 am größten, während er bei 44° mit 1.9 am kleinsten war. Bei den Zwischentemperaturen von 19—44° hielt er sich in etwa gleicher Höhe von rund 2.6. Die verschiedenen Temperaturen beeinflussten wohl den Zeitpunkt der Keimung, vermochten aber nicht den zeitlichen Unterschied in der Keimung der alten und jungen Konidien aufzuheben, höchstens ihn leicht zu beeinflussen. Im weiteren Wachstumsverlauf der Pilzrasen waren die Differenzen, wenn sie überhaupt bemerkt werden konnten, geringfügig, und genau so verhielt es sich mit der Konidienbildung.

Diese setzte bei den aus jungen Sporen gezogenen Mycelien verständlicherweise wohl eher ein, hatten sie doch früher Mycel gebildet;

die Unterschiede verschwinden aber, wenn wir die in der Tabelle I niedergelegten Werte betrachten, die angeben, an welchem Tag nach dem Auftreten des Mycels die Konidienfruktifikation begann.

Das Mycel, die Form der Konidien wie auch ihre Färbung war normal und eine Beeinträchtigung der Farbstoffbildung der Pilze nicht zu bemerken. BLOCHWITZ hatte dagegen Farbänderung der Konidien infolge Alters der ausgesäten Sporen beobachtet und daraufhin ganz allgemein angenommen, daß *Aspergillus*-Konidien, bevor sie ihre Keimfähigkeit einbüßen, die Fähigkeit zur Ausbildung gewisser Farbstoffe verlieren können. Der Befund von SCHRAMM, daß ein *Aspergillus*-Stamm, der 18 Jahre hindurch alle 2 Monate übergeimpft wurde, keine Konidienträger mehr entwickelte und anomale Mycelzellen ausbildete, die hefeartige Zellen abschnürten, interessiert hier weniger wegen der völlig andersartigen Bedingungen, unter denen sich diese Degeneration gebildet hatte.

Wachstum der aus verschieden alten Konidien gezogenen Mycelien.

Die bisherigen Versuchsreihen hatten ergeben, daß die ersten Mycelfäden nach Beimpfung eines Nährmediums mit alten Konidien später sichtbar wurden, als man es nach Beimpfung mit jungem Konidienmaterial beobachten konnte. Es entstand nun die Frage, ob die aus verschieden alten Sporen hervorgegangenen Pilzdecken in ihrem *Weiterwachstum* Unterschiede aufweisen würden, etwa derart, daß ein aus ihnen gezogenes Mycel mehr oder weniger geschädigt war und daher ein schwächeres Wachstum zeigte, wenngleich die oberen Versuchsreihen keine Schlüsse in dieser Hinsicht gestatten und ROBERG früher keine Beeinträchtigung des Mycelgewichtes durch das Alter der Konidien, die 2 Tage bis 16 Monate betrug, feststellen konnte. Demgegenüber beobachteten FREY u. POSCHENRIEDER aber eine gewisse Beeinflussung insofern, als jüngere Sporen höhere Ernten erbrachten als ältere, bis höchstens 6 Monate alte. Ferner fand WEHMER, daß ein aus älteren Konidien hervorgegangenes Mycel sich nur träge entwickelte, und bei RENON zeigten alte Sporen ein verzögertes Wachstum. Somit finden sich im Schrifttum sowohl Beobachtungen über Schädigung der aus älteren Sporen hervorgegangenen Pilzdecken, als auch solche, die keine Beeinträchtigung zeigten.

Der nächste Versuch sollte nun die obige Frage beantworten, wie sich die aus unseren 4 Tage und ca. 12 Jahre alten Konidien hervorgegangenen Mycelien zueinander verhalten würden, die also recht bedeutende Altersunterschiede aufwiesen.

Es wurden *zwei* Versuchsreihen unterschiedlicher Anordnung angesetzt; bei der ersten wurde beobachtet, *wie schnell* sich die aus verschieden alten Konidien gezogenen Mycelien auf einem *festen Nährboden ausbreiteten*, während bei der zweiten die *Gewichte der auf flüssigen Nährmedien gewachsenen Pilzdecken* festgestellt wurden.

Versuchsreihe 1, Kultur auf Nähragar.

Sterile Petrischalen von 90 mm Innendurchmesser wurden unter sterilen Kautelen mit 10 ccm verflüssigtem, sterilen Bierwürze-Malzextrakt-Agar beschickt. Nach dem Erstarren des Nährbodens wurde dieser in der Mitte durch einen Stich mit einer am Ende rechtwinklig abgebogenen Platinnadel mit den gewünschten Konidien — alte, 12 Monate alte und junge — beimpft. Versuchstemperatur: 34°.

Nach der Keimung bildete sich ein kreisförmiger Mycelrasen, der recht gleichmäßig nach allen Seiten hin wuchs. Seine Ausbreitung wurde täglich gemessen. Aus einem Vergleich der erhaltenen Werte ging die Zunahme der Ausbreitung des Mycels, seine *Wachstumsgeschwindigkeit* hervor. Das Ergebnis ist aus Tabelle II zu ersehen. Außerdem wurden von allen Kulturen täglich Aufnahmen gemacht. Zwei dieser Bilderserien stellen die Abbildungen 3—7 dar, die einen anschaulichen Eindruck des Wachstums von *Asp. niger* Rasse *Fulda* bzw. *Zwetsche* vermitteln. Da die von 12 Monate alten Konidien erhaltenen Werte sich nicht von denen der jungen unterschieden, sind sie in der Tabelle wiederum nicht aufgenommen. Stets wurden mehr Kulturen angelegt, als notwendig waren, da einerseits leicht Verunreinigungen auftreten können und es andererseits nicht immer gelingt, beim Anlegen der Impfstelle in der Mitte der Platte den übrigen Teil des Nährbodens steril zu halten; sehr leicht fallen nämlich beim Bewegen der Impfnadel über den Agarboden hin Konidien ab, die dann auch an anderer Stelle als nur der des Einstichs Mycelwachstum verursachen. Die Werte in den Tabellen wie auch die Abbildungen geben natürlich den Fortschritt des Wachstums auf der gleichen Kulturplatte wieder.

Das Ergebnis der Versuchsreihe zeigt bei allen Pilzen ein einheitliches und klares Bild. Das Auftreten des Mycels nach Beimpfung mit alten Konidien ist um einen Tag verzögert, in der Folge aber weisen die Wachstumsgeschwindigkeiten der Pilzrasen der einzelnen Rassen etwa gleiche Größen auf, wie aus einem Vergleich der Werte über den täglichen Zuwachs hervorgeht.

Irgendein Unterschied im Wachstum der Pilzrasen, mögen sie auf alte, 12 Monate alte oder junge Konidien zurückgehen, ist nicht festzustellen, die Mycelien verhalten sich in dieser Hinsicht gleich. *Eine Schädigung des Mycels infolge Alters der Konidien ist nicht zu bemerken.*

Hervorzuheben ist noch die Tatsache, daß die Neigung zu Sektorenbildung des Stammes *Zwetsche* erhalten geblieben ist und beide Mycelrasen, mögen sie auf alte oder junge Konidien zurückgehen, diese Aufspaltung in stark und schwach sporulierende Sektoren zeigen (Abb. 6 u. 7).

Versuchsreihe 2, Wachstum auf Nährlösung.

Aus der letzten Versuchsreihe ging hervor, daß die Geschwindigkeit des Weiterwachstums bzw. der Ausbreitung der aus alten und

Tabelle II. Wachstum der aus alten und jungen Konidien einiger *Aspergillus niger*-Rassen auf Nähragar in Petrischalen von 90 mm Durchmesser gezogenen Mycelien. Versuchstemperatur: 34° C.

Asp. niger Rasse	Koni- dien	Durchmesser der Mycelrasen in mm nach Tagen								tägliche Zunahme des Durchmessers der Mycel- rasen in mm nach dem ersten Wachstumstag							durch- schnitt- licher Zu- wachs mm/Tag
		1	2	3	4	5	6	7	8	2	3	4	5	6	7		
Fulda	alt	—	7	25	44	63	81	∞			18	19	19	18		18,5	
	jung	7	28	44	62	80	∞			21	16	18	18			18,2	
Göttingen neu	alt	—	22	35	53	70	82	∞			13	18	17	12		15,0	
	jung	9	30	45	62	80	∞			21	15	17	18			17,8	
Münster I	alt	—	20	28	36	46	63	80	∞		8	8	10	13	17	11,2	
	jung	8	25	32	40	50	65	80	∞	17	7	8	10	15	15	12,8	
Münster II	alt	—	20	30	35	45	67	73	∞		10	5	10	22	16	12,6	
	jung	9	29	35	45	65	78	∞		20	6	10	20	13		13,8	
Zweische	alt	—	13	35	60	79	∞				22	25	19			22,0	
	jung	12	32	53	74	∞				20	21	21				20,7	

Zeichenerklärung: — = kein Wachstum ∞ = Mycel hat den Innenrand der Schale erreicht.



Abb. 3. Nach 1 Tag.

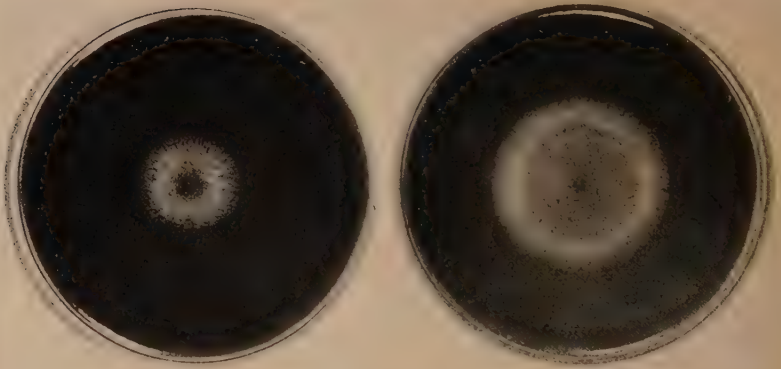


Abb. 4. Nach 3 Tagen.

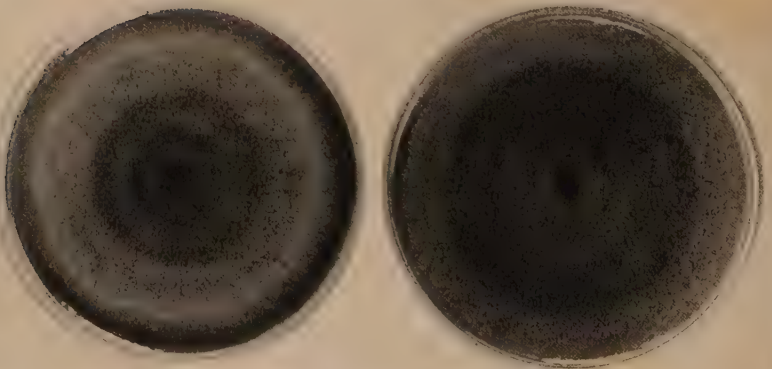


Abb. 5. Nach 6 Tagen.

Abb. 3—5. Wachstum von *Asp. niger* Rasse *Fulda* auf Nähragar in Petrischalen. Die linken Schalen wurden in ihrer Mitte mit alten, die rechten mit jungen Konidien beimpft.

jungen Konidien hervorgegangenen Mycelien auf der Oberfläche einer Nähragarplatte gleich groß war, sobald erstes Wachstum stattgefunden hatte. Ein Unterschied bestand nur in dem zeitlichen Auftreten der

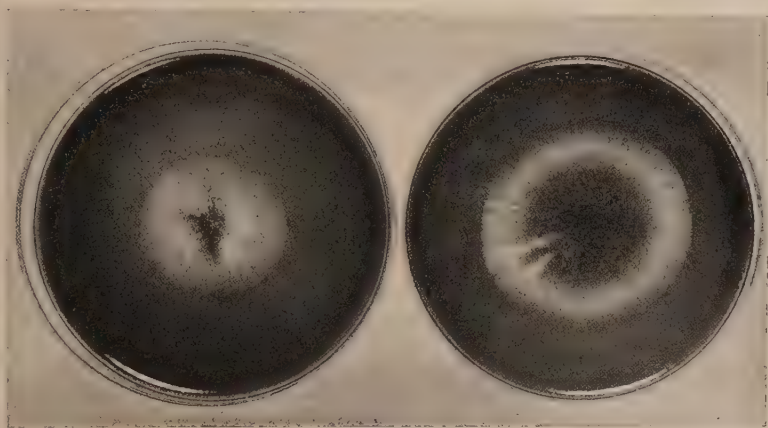


Abb. 6. Nach 3 Tagen.



Abb. 7. Nach 5 Tagen.

Abb. 6 u. 7. Wachstum von *Asp. niger* Rasse *Zwetsche* auf Nähragar in Petrischalen. Die linken Schalen wurden in ihrer Mitte mit alten, die rechten mit jungen Konidien beimpft. Sektorenbildung.

ersten Phase der Mycelbildung. Der Versuch sagt aber wenig aus über die Stärke der Pilzrasen, die nach einigen Angaben, wie bereits erwähnt, in gewisser Abhängigkeit vom Alter der als Impfgut verwendeten Konidien stehen kann. Da sich das Gewicht des Mycels einer auf Agar gewachsenen Kultur nur schwierig bestimmen läßt, wurden die Pilze nunmehr auf einer Nährlösung gezogen und nach Abtötung der Kultur durch Hitze die Trockengewichte der Decken in bekannter Weise ermittelt.

Nährlösung: Natriumnitrat 10.0 g, Kaliumbiphosphat 5.0 g, Magnesiumsulfat 2.5 g, Eisensulfat 0.025 g, Zinksulfat 0.01 g, Kupfersulfat 0.004 g, Handelszucker 100.0 g, Leitungswasser 1 L., auf pH 5.2 eingestellt.

200 ccm fassende Erlenmeyerkolben aus Jenaer Glas 20 wurden mit 50 ccm obiger Nährlösung beschickt, mit Wattestopfen verschlossen, sterilisiert durch Erhitzen auf 100° im Dampftopf an 2 aufeinander folgenden Tagen und gleichmäßig mit einer Sporensuspension beimpft.

Bei einem Vorversuch wurden folgende Mittelwerte der Mycelgewichte nach 4, 7 und 10 Tagen Kulturdauer bei 32° erhalten:

Versuchspilz: Rasse *Münster I*

nach Beimpfung mit alten Konidien: 0,55; 1,23; 1,05 g

nach Beimpfung mit jungen Konidien: 1,08; 1,12; 0,92 g

Versuchspilz: Rasse *Münster II*

nach Beimpfung mit alten Konidien: 0,90; 1,26; 0,84 g

nach Beimpfung mit jungen Konidien: 1,08; 1,02; 0,81 g

Bei dem Hauptversuch wurden die mit verschiedenen alten Konidien von *Asp. niger* Rasse *Münster II* beimpften Kolben bei zwei verschiedenen Temperaturen (24° und 34°) aufbewahrt und die Gewichte der Pilzdecken täglich bestimmt, um so ihre fortschreitenden Gewichtsveränderungen besser beobachten zu können. ROBERG hatte früher gefunden, daß der Höhepunkt der Mycelentwicklung auf der benutzten Nährlösung, das höchste Erntegewicht, bei 33—34° nach ca. 5 Tagen erhalten wurde. 34° dürfte dem Temperaturoptimum des Pilzes nahe liegen, das in leichter Abhängigkeit von der Rasse nach verschiedenen Autoren zwischen 30 und 40° liegt. JANISCH hält 31° für die optimale Temperatur, da hier der Pilz in Gegenwart von Giften die stärkste Vitalität zeigte, während die beste Konidienbildung bei 35,6° stattfand. Die Mittelwerte aus drei Parallelkolben sind aus Tabelle III zu ersehen.

Zunächst seien die bei 24° erhaltenen Werte besprochen. In Bestätigung des in Tabelle I wiedergegebenen Ergebnisses ist der erste Mycelschleier bei den alten Konidien nach 3 Tagen, bei den jungen bereits nach 1 Tag sichtbar. Die Erntegewichte steigen in den weiteren Tagen an und erreichen bei den alten Konidien nach 9, bei den jungen nach 7 Tagen ihren Höchststand, um dann langsam abzufallen. Die aus alten Konidien hervorgegangenen Pilzdecken erbringen sogar höhere Erntegewichte als die aus jungen gezogenen, 1500 gegen 1220 mg. In beiden Fällen ist an dem Tag, an dem der Pilz die maximalen Ernterträge erbringt, der Zucker verbraucht.

Fast gleichsinnig verlief die Entwicklung der Pilze bei 34°, wenn gleich hier das erste Auftreten des Mycels infolge der höheren Temperatur zeitlich eher zu beobachten war. Das aus alten Konidien hervorgegangene Mycel erreichte ebenfalls eine, wenn auch geringere und sich zudem innerhalb der Streubreite haltende Höhe als das aus jungen gezogene, 1200 gegen 1170 mg.

Die mit den übrigen *Aspergillus*-Rassen erhaltenen Werte wiesen keine Besonderheiten auf und unterschieden sich grundsätzlich nicht

Tabelle III. Wachstum von *Aspergillus niger* Rasse Münster II auf 50 cm Nährlösung in 200 cm fassenden Ertenmeyerkolben nach Beimpfung mit alten bzw. jungen Konidien. Mittelwerte von 3 Parallelkolben.

Kulturdauer in Tagen	Versuchstemperatur: 24° C						Versuchstemperatur: 34° C					
	Konidien: alt			Konidien: jung			Konidien: alt			Konidien: jung		
	pH ^{*)}	Zucker ^{**)}	Mycelgewicht mg	pH	Zucker	Mycelgewicht mg	pH	Zucker	Mycelgewicht mg	pH	Zucker	Mycelgewicht mg
1	5,2	+	—	5,2	+	gekeimt***)	5,2	+	—	5,2	+	gekeimt***)
2	5,2	+	—	4,8	+	Mycel- schleier***)	5,2	+	gekeimt***)	4,5	+	210
3	5,2	+	gekeimt***)	4,1	+	280	4,8	+	280	4,2	+	650
4	4,6	+	30	4,0	+	450	4,7	+	790	4,4	+	870
5	4,1	+	310	3,9	+	920	5,5	+	1120	5,7	—	1170
6	4,5	+	870	4,4	+	1180	6,0	—	1180	5,9	—	960
7	5,2	+	1320	4,7	—	1220	6,2	—	1200	6,4	—	930
8	5,5	±	1450	5,4	—	1160	6,2	—	1120	6,7	—	870
9	5,8	—	1500	5,8	—	1150	6,3	—	940	6,9	—	840
10	4,9	—	1350	6,2	—	1100	6,5	—	850	7,0	—	780
11	4,8	—	1320	6,4	—	1060	6,8	—	820	7,1	—	750

*) *pu* wurde gemessen mit der Chinhydronelektrode und dem Ionometer nach LAUTENSCHLÄGER.

**) Reaktion nach FEHLING positiv bzw. negativ.

***), Gewichte nicht bestimmt.

von den oben niedergelegten, weshalb von ihrer Wiedergabe abgesehen sei.

Alle Versuchsreihen zeigen, daß aus den alten Sporen unserer *Aspergillus niger*-Rassen ein gesundes, keineswegs geschwächtes Mycel hervorgeht, das praktisch dieselben Gewichtsmengen an Pilzmaterial zu produzieren vermag wie das aus jungen Sporen gezogene⁴.

Nach der unterschiedlichen Veränderung des pH-Wertes der Kulturlösungen im Verlaufe der Versuchstage zu urteilen, scheinen die auf verschiedenen alte Konidien zurückgehenden Mycelien jedoch Unterschiede in ihrem physiologischen Verhalten aufzuweisen und sich der biologische Zustand verändert zu haben, wie früher für andere Rassen unseres Pilzes von mehreren Autoren gezeigt werden konnte (u. a. SAKAMURA, KADELBACH, SCHWARTZ u. LANG, RIPPEN u. KREUTZMANN, PALEY, JACOBI u. SCHWARTZ). Wir wandten uns in der Folge auch diesen Fragen zu und untersuchten die Säurebildung der beiden auf ungleichaltrige Sporen zurückgehenden Pilzdecken. Die Versuche erbrachten eine Bestätigung der soeben geäußerten Vermutung, daß im physiologischen Verhalten der Mycelien infolge des Alters der ausgesäten Konidien Unterschiede bestehen. In einer gesonderten Abhandlung hoffen wir auf diese Ergebnisse näher eingehen zu können.

Keimversuche mit mikroskopischer Beobachtung.

Wie oben gezeigt wurde, war die Keimung alter Konidien verschiedener *Asp. niger*-Rassen, genauer gesagt, das erste sichtbare Mycelwachstum, stets verzögert gegenüber der Keimung junger Konidien. Welcher Teil der Keimung war nun verzögert oder verlangsamt? Das Quellen der Konidien, die Ausbildung des ersten Keimschlauches oder evtl. die ersten Wachstumsstadien des sich nunmehr bildenden Mycels, das aber in den späteren Wachstumsperioden keinerlei Unterschiede in der Entwicklung erkennen ließ? Da eine Beantwortung dieser Fragen

⁴ Diese Versuche mit der zahlenmäßigen Bestimmung der auf Nährlösung gebildeten Pilzdecken, wie auch die oben beschriebenen, die das Wachstum der Pilze in Reagensgläsern bei verschiedenen Temperaturen und auf Agarplatten zeigten, wurden ferner mit den folgenden s. Zt. zur Verfügung stehenden *Aspergillus*-Arten durchgeführt: *Aspergillus Ficum* (Reichardt) Hennings, — *Fischeri* Wehmer, — *flavus* Link, — *fumigatus* Fresenius, — *fuscus* Schieman und — *niger altipes* Schieman; Wachstumsversuchen auf Kartoffelschnitzeln in Reagensgläsern wurden ferner folgende Pilze unterzogen: *Asp. amoebus* Roberg, — *glauca* Link und — *candidus* (Link?) Wehmer. Das Alter dieser Kulturen betrug 13—16 Jahre.

Sie erbrachten einheitlich das gleiche Bild, wie es oben bei den 5 *Asp. niger*-Rassen beschrieben wurde. Bei allen Arten war das Auftreten des ersten Mycels nach der Beimpfung mit alten Konidien verzögert gegenüber dem Sichtbarwerden des Mycels nach Beimpfung mit jungen. Hatte jedoch Wachstum eingesetzt, so war in der weiteren Entwicklung der Pilzrasen kein größerer Unterschied mehr zu beobachten.

Da die tabellarischen Versuchsaufzeichnungen infolge Kriegseinwirkung verloren gingen, kann über die zahlenmäßigen Ergebnisse leider nicht berichtet werden.

nur nach mikroskopischer Beobachtung der Keimungsvorgänge möglich war, wandten wir uns nunmehr diesen Versuchen zu.

Unter sterilen Kautelen wurde auf sterile Objektträger mittels eines Paraffin-Vaseline-Gemisches mit geringem Lanolinzusatz ein mit demselben Gemisch überzogener, 4 mm hoher, vernickelter Messingring von 18 mm ϕ aufgeklebt. Auf den Boden der so erhaltenen Kammer kam etwas steriles Wasser. Bedeckt wurde sie mit einem großen Deckglas, das mit einem verflüssigten Paraffin-Vaseline-Gemisch dem Metallring aufgeklebt wurde, nachdem auf die Unterseite des Deckglases ein großer Tropfen verflüssigter, vor dem Erstarren mit wenig Konidienmaterial vermischter Nähragar gebracht worden war.

Die Keimung der verimpften Konidien wurde dann in einem Zimmer mit konstanter Temperatur von $23^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}$ unter dem Mikroskop verfolgt. Die Beheizung des Zimmers erfolgte durch eine Warmwasserheizung und zusätzlich durch einen elektrischen Heizofen, dessen Stromzufuhr durch ein von einem Kontaktthermometer gesteuertes Relais geregelt wurde. Benutzte Optik: Leitz Objektive $10\times$, $25\times$ und 45 L ; Leitz periplanes Okular $15\times$.

Von allen *Aspergillus*-Arten wurden die Präparate mit den verschieden alten Konidien stets gleichzeitig angesetzt, um Fehlerquellen nach Möglichkeit auszuschließen. Von jeder Kultur wurden 2, zeitlich getrennte Versuche mit je 2–3 Konidienpräparaten angefertigt, so daß nach Beobachtung von 4–6 Präparaten pro Kultur die Keimung der Konidien beurteilt werden konnte.

Nähragar: Ammoniumnitrat 1,25 g, Kaliumbiphosphat 0,5 g, Magnesiumsulfat 0,5 g, Eisensulfat 0,05 g, Zinksulfat 0,05 g, Kupfersulfat 0,0125 g, Handelszucker 62 g, Agar-Agar 10,0 g, Leitungswasser 1 L. Nach Filtration durch ein Papierfilter wurde der Nähragar auf $\text{pH} = 5,4$ eingestellt und im Autoklaven sterilisiert.

Bei der mikroskopischen Beobachtung wurde besonders beachtet:

1. das Quellen der Konidien,
2. ihr erstes Keimstadium, d. h. das Austreten eines Keimschlauches, und
3. der Zeitpunkt, an dem bestimmte Prozentsätze an gequollenen bzw. gekeimten Konidien festzustellen waren.

Bei der Bestimmung dieser Prozentsätze begnügten wir uns mit der Feststellung der ungefähren Hundertsätze, die für unsere Fragestellung genügte, durch Auszählen mehrerer Gesichtsfelder. Häufig mußte allerdings geschätzt werden, da die Sporen in Haufen zusammenlagen. Tabelle IV zeigt die erhaltenen Ergebnisse. In ihr fanden auch die Werte Aufnahme, die mit 12 Monate alten Konidien erhalten wurden, die sich von denen der jungen Konidien unterschieden. Früher wurden derartige Differenzen in der Keimungszeit der jungen und 12 Monate alten Sporen bei allen anderen Versuchsanordnungen nicht gesehen, da diese eine so genaue und einwandfreie Beobachtung nicht gestatteten.

Die Keimung an sich bot nichts Besonderes, sie vollzog sich bei allen Rassen in der bekannten und beschriebenen Form. Die dunklen Konidien quollen nach gewisser Zeit und wurden durchsichtiger, sie veränderten ihre Gestalt — die runde bzw. leicht ovale Form ging in eine leicht abgerundet-eckige über — und dann stülpte sich an einer

Stelle ein Keimschlauch hervor. Später traten meistens noch weitere Schläuche aus, die in der Folge zu mehr oder weniger verzweigten Pilzfäden heranwuchsen und ein dichtes Hyphengeflecht bildeten, aus dem

Tabelle IV. *Keimung verschieden alter Konidien einiger Aspergillus niger-Rassen bei 23° C unter mikroskopischer Beobachtung.*

Rasse	Alter der Konidien	a	b	c		d	e		f		g		
		Erste Konidie war gequollen	5 % Konidien waren gequollen	Zeit zwischen a und b	10 % Konidien waren gequollen	Zeit zwischen b und c	Erste Konidie war gekeimt	Zeit zwischen a und d	5 % Konidien waren gekeimt	Zeit zwischen b und e	10 % Konidien waren gekeimt	Zeit zwischen c und f	25 % Konidien waren gekeimt
		nach bzw. in Stunden											
Fulda	12 Jahre	30	36	6	42	6	45	15	72	36	—	—	—
	12 Monate	8	9	1	10	1	10	2	11	2	15	5	20
	4 Tage	7	8	1	9	1	10	3	12	4	16	7	20
	Verzögerungsfaktor	4,3	4,5		4,7		4,5		6				
Göttingen neu	13 Jahre	32	37	5	42	5	42	10	72	35	—	—	—
	12 Monate	9	10	1	11	1	10	1	13	3	15	4	20
	4 Tage	7	9	2	10	1	10	3	12	3	16	6	20
	Verzögerungsfaktor	4,6	4,1		4,2		4,2		6				
Münster I	13 Jahre	30	36	6	42	6	40	10	48	12	54	12	60
	12 Monate	8	9	1	10	1	10	2	12	3	14	4	17
	4 Tage	6	8	2	9	1	7	1	9	1	12	3	14
	Verzögerungsfaktor	5	4,5		4,7		5,3		4,5		4,5		4,3
Münster II	13 Jahre	30	36	6	42	6	38	8	54	18	60	18	—
	12 Monate	8	9	1	10	1	10	2	11	2	12	2	14
	4 Tage	5	6	1	7	1	6	1	8	2	9	2	11
	Verzögerungsfaktor	6	6		6		6,3		6,7		6,6		
Zwetsche	13 Jahre	30	36	6	42	6	52	12	66	30	—	—	—
	12 Monate	10	11	1	13	2	11	1	13	2	15	2	18
	4 Tage	6	8	2	10	2	10	4	12	4	15	5	18
	Verzögerungsfaktor	5	4,5		4,2		5,2		5,5				

sich bald die ersten Konidienträger, die bekannten Aspergillusköpfchen, bildeten.

Die Quellung und besonders die Keimung der einzelnen Konidien war sehr *ungleichmäßig*. Während bei Rasse *Fulda* z. B. die erste junge Konidie schon nach 10 Stunden einen Keimschlauch entwickelte und 2 Stunden später 5 % der Konidien gekeimt waren, waren nach weiteren 8, also insgesamt 20 Stunden 25 % zur Keimung geschritten. Inzwischen

hatte sich von den zunächst gekeimten bereits ein dichtes Mycelgeflecht entwickelt, das weitere Beobachtung der ungekeimten Sporen erschwerte, teilweise praktisch unmöglich machte. Daher konnte auch die bei den mit alten Konidien beimpften Präparaten besonders interessierende Frage nicht entschieden werden, wieviel Prozent der Sporen noch auskeimten bzw. bereits abgestorben waren, zumal hier die Differenzen in der Keimungszeit der einzelnen Konidien bedeutend größer waren. Um dies mit einiger Genauigkeit bestimmen zu können, hätte man mit einer großen Zahl von Präparaten arbeiten müssen, die jeweils nur wenige Konidien enthalten durften, geplante Versuche, die wegen der Zeitumstände nicht mehr zur Ausführung kamen. Hatten doch bei Rasse *Münster I*, deren erste Konidie nach 40 Stunden gekeimt war, erst nach insgesamt 60 Stunden 25 % Sporen Keimschläuche gebildet. Nach den Erfahrungen von DE BARY und ROBERG ist zu schließen, daß die Konidien einer *Aspergillus*-Kultur im Laufe der Zeit nicht gleichmäßig, sondern nach und nach absterben. PALEY fand, daß die Keimprozentage 4, 8 und 12 Monate trocken aufbewahrter Konidien in allen Fällen 70 bis 80 % betrugen. Genauere Untersuchungen über den mit dem Alter fortschreitenden Absterbeprozess der Sporen fehlen jedoch.

Wenn somit in dieser letzten Frage keine Klärung erzielt werden konnte, so gaben die Versuche doch ein schönes Bild von dem unterschiedlichen Verhalten der ungleichalterigen Konidien und sie zeigten auch, welche Stadien der Keimung bei den alten Konidien verzögert waren.

So trat zunächst das Vorstadium der eigentlichen Keimung, die Quellung, später ein, dann war weiter besonders stark verzögert der zwischen der stattgefundenen Quellung und der Keimung, der Bildung des ersten Keimschlauches, liegende Zeitraum. Und zwar gebrauchten die alten Konidien hierzu durchschnittlich etwa die fast 10fache Zeit gegenüber den jungen, während sie zur Quellung nur rund die 4—5fache benötigten. *Es waren also beide Phasen, die der Quellung wie der Keimung, verzögert.* Hatten sich Keimschläuche gebildet, so bemerkte man im Wachstum der Hyphen keinen Unterschied, sie wuchsen — wie wir es nach dem Ausfall der bisherigen Versuche erwarten konnten — gleichstark weiter.

Bei den mit alten Konidien beimpften Präparaten fand niemals Wachstum der zufällig mitübertragenen Lufthyphen statt; diese waren infolge ihres Alters stets abgestorben. Wie sich die im Innern des Nährbodens befindlichen alten Hyphen verhalten haben würden, wurde nicht festgestellt. Obwohl nach WEHMER Mycel teilweise ein höheres Alter erreichen kann als die Konidien, möchten wir annehmen, daß in unseren Kulturen das gesamte Mycel abgestorben war und nur die Sporen die lange Lagerzeit von 13 Jahren lebend überstanden hatten. Daß im Gegensatz hierzu die Hyphen der jungen Kulturen noch lebten und im Nähragar weiterwuchsen, ist verständlich und bedarf kaum der Erwähnung, waren sie doch höchstens einige Tage alt.

Die mikroskopische Beobachtung der Konidienkeimung hatte also ergeben, daß bei den alten Konidien sowohl die der eigentlichen Keimung vorausgehende Quellung der Konidien später einsetzte als bei den jungen, wie auch die Keimung selbst.

Die Quellung der Konidien muß — in Analogie mit der Quellung und anschließenden Keimung von trockenen Samen — zunächst als ein rein mechanischer Vorgang betrachtet werden und dann weiter als Beginn des Wachstums. Während ersterer eine *physikalische* Erscheinung ist, dem lebende wie abgestorbene Konidien unterworfen sind, geht jene auf eine Tätigkeit des lebenden Plasmas zurück und ist Ausdruck eines *Lebensvorganges*. Bevor das eingetrocknete Plasma eine Lebensäußerung zeigen kann, muß es auf mechanischem Weg das notwendige Quellungswasser aufgenommen haben. Es mag daher zunächst verständlich sein, daß bis 4 Tage alte Konidien eher keimen als 13jährige, ist doch bei ersteren das Plasma noch keineswegs ausgetrocknet und so stark von Feuchtigkeit befreit wie bei diesen, und so konnte die erste Wasseraufnahme schneller vor sich gehen. Daß diesem Grund aber nur eine untergeordnete Rolle zukommt, sagen schon die bei der Keimung der 12 Monate alten Konidien erhaltenen Werte. Hier war die Quellung nur geringfügig verzögert, obschon die Konidien sicherlich ausgetrocknet waren. Die Verzögerung belief sich auf 1—3 Stunden und ist wohl auf den unterschiedlichen Wassergehalt der Konidien zurückzuführen, nach erfolgter Quellung keimten beide jedoch ziemlich gleichzeitig. Es ist natürlich möglich, aber kaum anzunehmen, daß die 12 Monate alten Konidien bereits infolge Alters leicht geschädigt waren und daher eine längere Quellungszeit benötigten, wie wir es bei den 13 Jahre alten Konidien annehmen möchten.

Noch klarer in dieser Beziehung erscheint der nächste Versuch, bei dem die zur Keimung benutzten Konidien fast 1 Jahr lang einer scharfen Wasserentziehung im Exsikkator unterworfen und sicher hier soweit als möglich von Feuchtigkeit befreit worden waren.

Die auf Kartoffeln in Reagensgläsern bei 34° gezogenen Pilze wurden bis zur Austrocknung des Nährbodens im Thermostaten belassen und nach 4 Wochen in einen im Zimmer befindlichen, mit Phosphorpentoxyd beschickten Exsikkator gelegt, wo extreme Wasserentziehung erfolgen konnte. Parallelkulturen wurden unter normalen Verhältnissen gelagert. Nach weiteren 11 Monaten wurde die Keimung dieser beiden unter verschiedenen Bedingungen aufbewahrten und nunmehr 12 Monate alten Konidien mikroskopisch verfolgt.

Die in Gegenwart von P_2O_5 gehaltenen Konidien gebrauchten zur Quellung 1—2 Stunden mehr als die anderen, aber nach der Quellung bis zur Keimung durchschnittlich die gleiche Zeit. Es war bei ihnen demnach regelmäßig *die erste Phase der Keimung, die Quellung, verzögert*, hervorgerufen durch die starke Austrocknung, die wahrscheinlich die rein mechanische Wasseraufnahme erschwerte, während die eigentliche Keimzeit nicht verlängert war. Eine Schädigung der Sporen durch die starke Austrocknung konnte nicht festgestellt werden, auch

schiene sich die Keimprozentage nicht verringert zu haben. HEINTZELER machte demgegenüber mit *Penicillium glaucum* gegenteilige Erfahrungen. Schon nach 14tägigem Aufenthalt in trockener Luft keimten nahe dem Temperaturoptimum nur noch geringe Hundertsätze, wobei sich die Keimzeit um das Doppelte gegenüber frischen Sporen verzögert hatte. Und BERNHAUER, IGLAUER u. KNOBLOCH fanden nach 9monatiger Lagerung der Sporen von *Asp. niger* im Vakuum eine Beeinträchtigung ihrer Keimfähigkeit.

Ursprünglich waren unsere Exsikkatorenkulturen angelegt worden als ein Versuch, die Alterung der Konidien künstlich zu beschleunigen, wie RIPPEL u. KREUTZMANN es bereits durchgeführt hatten, um so ihre Keimzeit zu verlängern. In dieser Hinsicht mußte er allerdings als erfolglos betrachtet werden.

Nunmehr finden auch die Ergebnisse zweier, schon früher durchgeführter, aber noch nicht erwähnter Versuche, die jetzt nachgetragen seien, eine bessere Beleuchtung: durch Vorbehandlung der alten Konidien ihre Keimungsverzögerung zu *verringern*, also das Gegenteil des im letzten Experimente angestrebten Erfolges zu erreichen.

Von der berechtigten Vermutung ausgehend, daß die verzögerte Keimung der alten Konidien z. T. auf eine erschwerte Wasseraufnahme infolge starker Austrocknung des Plasmas zurückzuführen sei, wurden Versuche angesetzt, diesen Unterschied zu beseitigen bzw. zu verringern. — Die Sporen wurden zunächst einige Tage in Feuchtigkeit gehalten bei tiefen Temperaturen, die wohl eine mechanische Wasseraufnahme, nicht aber ein Auskeimen gestatteten, anschließend kamen sie in den Thermostaten, in dem Wachstum eintreten konnte. Beruhte die verzögerte Keimung der alten Konidien ausschließlich auf einer erschwerten Wasseraufnahme infolge Austrocknung des Plasmas, so mußte diese Verzögerung nunmehr verschwinden, da es sich bereits bei der zur Keimung ungünstigen Temperatur mit Wasser sättigen konnte.

Versuch 1. Steriles, in Reagensgläsern mit Watteverschluß befindliches Leitungswasser wurde mit alten bzw. jungen Konidien unserer Versuchspilze versetzt und 7 Tage bei ca. 0° gehalten. Die Konidienaufschwemmungen dienten dann zur Beimpfung von Bierwürze-Malz-extraktagar-Röhrchen, die bei 34° aufbewahrt und alle 12 Stunden auf Mycelwachstum untersucht wurden. Es zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede gegenüber den früher erhaltenen und in der Tabelle I wiedergegebenen Werten: die Differenzen in den Keimzeiten der beiden verschieden alten Konidien hatten sich nicht verringert.

Versuch 2. Nunmehr wurden Agarplatten in schon beschriebener Weise in der Mitte mit alten bzw. jungen Konidien beimpft, 4 Tage bei ca. 0° aufbewahrt und anschließend in den Brutschrank gebracht. Die Durchmesser der Mycelrasen wurden täglich gemessen; ihre Werte unterschieden sich nicht merklich von denen der Tabelle II.

Hier sei an unsere ersten Versuche erinnert. Dort hatten wir u. a. mit den verschiedenen Konidien beimpfte Agarröhrchen 4 Wochen lang bei den für das Wachstum von *Asp. niger* ungünstigen Temperaturen

von 4, 49 und 54° aufbewahrt, ohne daß Keimung eingetreten war. Als sie nach dieser Zeit in einen auf 34° eingestellten Thermostaten gebracht wurden, trat, in Übereinstimmung mit den soeben beschriebenen Versuchen, zunächst Mycelentwicklung der jungen, später der alten Konidien ein. Damals hatte sich also bereits gezeigt, daß die infolge stärkerer Austrocknung erschwerte Wasseraufnahme der alten Konidien nicht der Hauptgrund für das zeitlich unterschiedliche Auskeimen der verschieden alten Konidien sein konnte, wie es denn auch die späteren mikroskopischen Beobachtungen ergeben haben.

Wir dürfen annehmen, daß wahrscheinlich alle Konidien durch ihr vorheriges Verweilen in Wasser bzw. Nähragar bei ca. 0° rein mechanisch mit Quellungswasser gesättigt waren, als sie bei der für Keimung und Wachstum günstigeren Temperatur mit der weiteren, vitalen Wasseraufnahme, der eigentlichen Keimung begannen. Da aber die physikalische Quellung nur den geringsten Teil der Keimzeit beansprucht, so konnte ihre als Folge der Vorbehandlung der Konidien evtl. geringe Verminderung bei den verwendeten Versuchsanordnungen keinesfalls erfaßt werden.

Besprechung der Ergebnisse.

Bei der Prüfung älterer *Aspergillus*-Kulturen auf ihren Lebenszustand hatte ROBERG gefunden, daß rund 12 Jahre alte Konidien bei 34° auf frischen Nährböden später keimten als junge, wenige Tage alte, sich aber die aus ihnen gezogenen Mycelien weder in der Wachstumsintensität, noch der Konidienfruktifikation unterschieden. In Fortsetzung dieser Untersuchungen mit fünf von ROBERG benutzten Rassen von *Asp. niger* konnten zunächst seine Beobachtungen bestätigt und weiter festgestellt werden, daß Änderung der Versuchstemperatur — von 9—39° C — keinen Einfluß ausübte. Stets war die Keimung der nunmehr ca. 13 Jahre alten Konidien verzögert gegenüber der von jungen, falls die Versuchstemperaturen ein Auskeimen gestatteten (Tab. I und Abb. 1 u. 2).

Hatte Keimung stattgefunden und sich Mycel gebildet, so unterschieden sich die Pilzrasen in der Stärke ihres Wachstums in keiner Weise. Sie breiteten sich auf Nähragarplatten gleichschnell aus (Tab. II und Abb. 3—7) und bildeten auf Nährlösungen Decken von gleichem Gewicht (Tab. III). Es schien jedoch, als ob die auf Konidien unterschiedlichen Alters zurückgehenden Mycelien Unterschiede in ihrem *physiologischen* Verhalten zeigten und sich ihr biologischer Zustand verändert hatte, ein Befund, der Anregung zu gesonderten, ausgedehnten Versuchen in dieser Richtung gab. Bei vergleichenden Untersuchungen mit *Aspergillus*-Kulturen ist es daher zweckmäßig, von ungefähr gleich alten Konidien auszugehen, eine vorsorgliche Maßnahme, um in dieser Richtung liegende, mögliche Fehlerquellen von vornherein auszuschließen, wie im Schrifttum bereits verschiedentlich empfohlen wurde.

Die Verzögerung in der Keimung der alten Konidien beruhte zu einem geringen Teil auf der stärkeren Austrocknung des Plasmas, die

eine erste, mechanische Wasseraufnahme und Quellung erschwerte, wie aus Versuchen mit fast 1 Jahr in einem mit P_2O_5 beschickten Exsikkator aufbewahrten Sporen hervorging. Diese gebrauchten, wohl rein aufgrund der stärkeren Austrocknung, zu ihrer Quellung eine etwas längere Zeit als gleichalterige, normal aufbewahrte Konidien, während die zwischen Quellung und Bildung der Keimschläuche liegende Zeit gleich lang war. Das spätere Auskeimen der ca. 13 Jahre alten Konidien geht wahrscheinlich in der Hauptsache auf Schädigung infolge des Alters zurück und ist als eine Alterserscheinung aufzufassen. Welcher Art diese durch das Alter hervorgerufene Veränderung, die „Alterschädigung“ ist, läßt sich unseren Versuchen nicht entnehmen und es sei dahingestellt, ob sie sich überhaupt ermitteln läßt. Vielleicht haben sich Veränderungen im Enzymgefüge abgespielt, auch können Umsetzungen bzw. Zersetzungen im Plasma oder mitgeführter Stoffe stattgefunden haben. Es sei, wie es sei, bei der Keimung der alten Konidien wurde regelmäßig eine Verlängerung der Keimungszeit gegenüber 4 Tage oder auch 12 Monate alten Konidien beobachtet, wobei der Verzögerungsfaktor durchschnittlich um 5 betrug.

Versuche mit verschiedenen alten Konidien anderer *Aspergillus*-Arten ergaben den gleichen Befund, wie er mit *Asp. niger*-Sporen gewonnen wurde. Ob und wieweit sich die an *Aspergillus* erhaltenen Ergebnisse verallgemeinern lassen, müssen weitere Untersuchungen ergeben.

Zusammenfassung.

12—13 Jahre alte Konidien von 5 *Aspergillus niger*-Rassen keimten später als 12 Monate alte und junge, etwa 4 Tage alte, wobei die Versuchstemperatur grundsätzlich ohne Bedeutung war, falls sie Keimung gestattete.

Verzögert war nach mikroskopischen Beobachtungen sowohl die der eigentlichen Keimung vorausgehende Quellung der Sporen, als auch die Keimung selbst.

Die spätere Keimung der älteren Konidien beruhte zu einem geringen Teil auf stärkerer Austrocknung, die eine mechanische Wasseraufnahme erschwerte, in der Hauptsache jedoch war sie eine Folge des Alters, eine Alterserscheinung.

Hatte Keimung stattgefunden, so war kein Unterschied festzustellen in der Wachstumsstärke und der Konidienfruktifikation zwischen den Mycelien, die auf ungleichalterige Konidien zurückgingen; sie breiteten sich auf Nähragarplatten gleich schnell aus, bildeten auf Nährlösungen Decken von gleichem Gewicht und entwickelten Konidien von normaler Form und Farbe.

Literatur.

BARY, A. DE: Vergleichende Morphologie und Biologie der Pilze, S. 373. Leipzig 1884. — BEHR, G: diese Zeitschr. 1, 418 (1930). — BERNHAUER, K., IGLHAUER, A., u. H. KNOBLOCH: Biochem. Zeitschr. 307, 293 (1941). —

BLOCHWITZ, A.: Ber. d. Deutsch. bot. Ges. **41**, 205 (1923). — BREFELD, O.: Bot. Unters. über Schimmelpilze. Heft III, S. 66, Leipzig 1877.

EIDAM, E.: Beitr. Biol. d. Pfl. **3**, 397 (1883).

FREY, A., u. H. POSCHENRIEDER: diese Zeitschr. **3**, 409 (1932).

HANSEN, E. CHR.: Bot. Zeitung, **55**, 1. Abt., 127 (1897). — HEINTZELER, I.: diese Zeitschr. **10**, 92 (1939).

JACOB, K., u. W. SCHWARTZ: diese Zeitschr. **10**, 226 (1939). — JANISCH, E.: Zentralbl. f. Bakt. II, **101**, 120 (1939/40).

KADELBACH, E.: Jahrb. f. wissenschaft. Bot. **75**, 399 (1931).

McCREA, A.: Science (N. Y.), N. S. **58**, 426 (1923).

PALEY, T.: diese Zeitschr. **7**, 206 (1936).

RIPPEL, A., u. P. H. KREUTZMANN: diese Zeitschr. **6**, 276 (1935). — RENON: Étude sur l'aspergillose chez les animaux et chez l'homme. Zit. nach Lode, Arch. f. Hyg. **42**, 107 (1902). — ROBERG, M.: diese Zeitschr. **14**, 1 (1948). — ROBERG, M.: Centralbl. f. Bakt. II, **74**, 333 (1928). — ROBERG, M.: ebenda **84**, 218 (1931).

SAKAMURA, T.: Planta **11**, 765 (1930). — SCHRAMM, R.: Centralbl. f. Bakt. II, **44**, 177 (1915). — SCHWARTZ, W., u. H. LANG: diese Zeitschr. **5**, 387 (1934).

WEHMER, C.: Die Pilzgattung Aspergillus. Mem. de le Soc. Phys. de Genève **33**, 2. Teil, Nr. 4 (1901). — WEHMER, C.: Centralbl. f. Bakt. II, **3**, 104 (1897). — WEHMER, C.: Ber. d. Deutsch. bot. Ges. **22**, 476 (1904) — WEHMER, C.: Biochem. Zeitschr. **197**, 418 (1928).

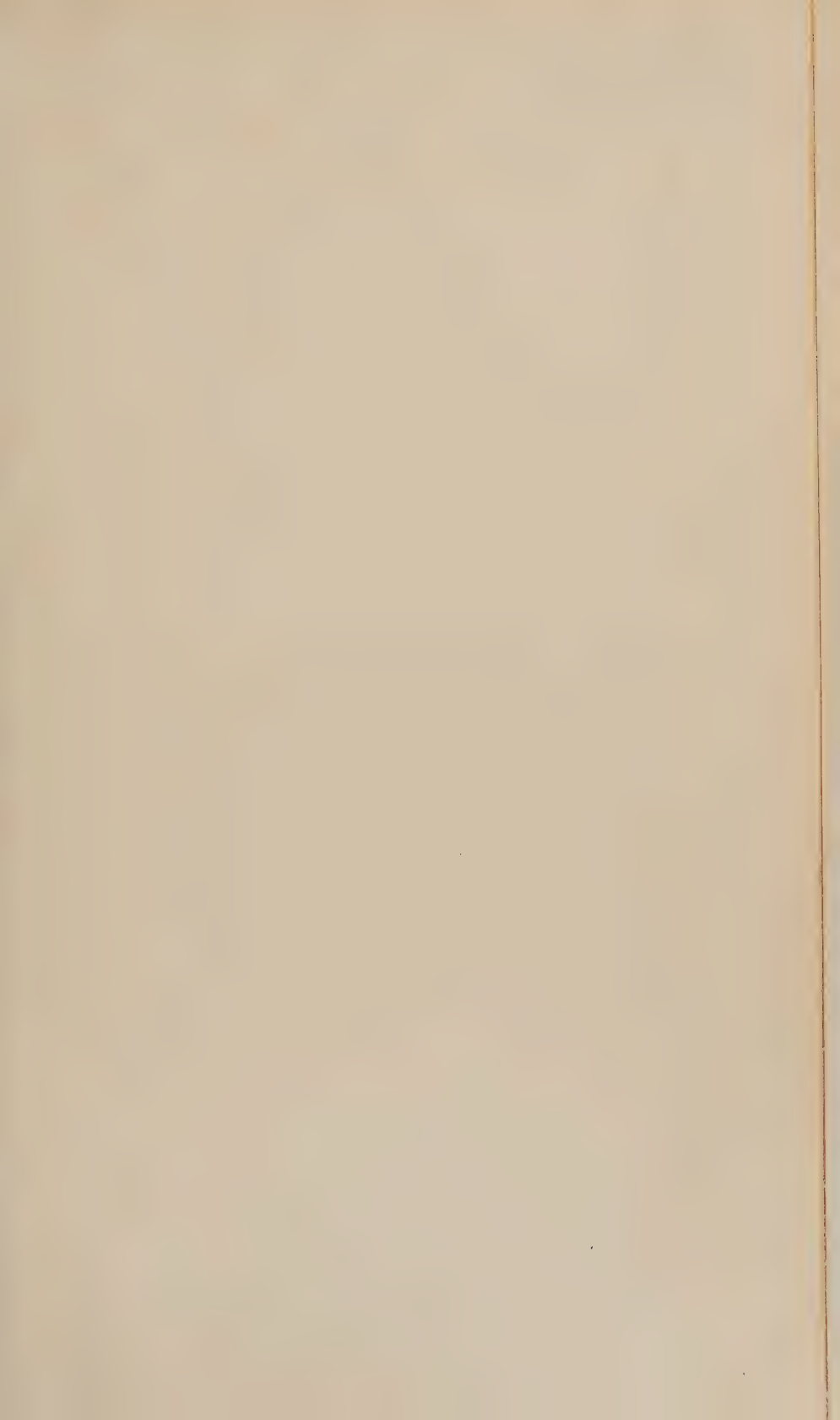
ZOBL, K. H.: diese Zeitschr. **13**, 14 (1943).

Autoren-Verzeichnis.

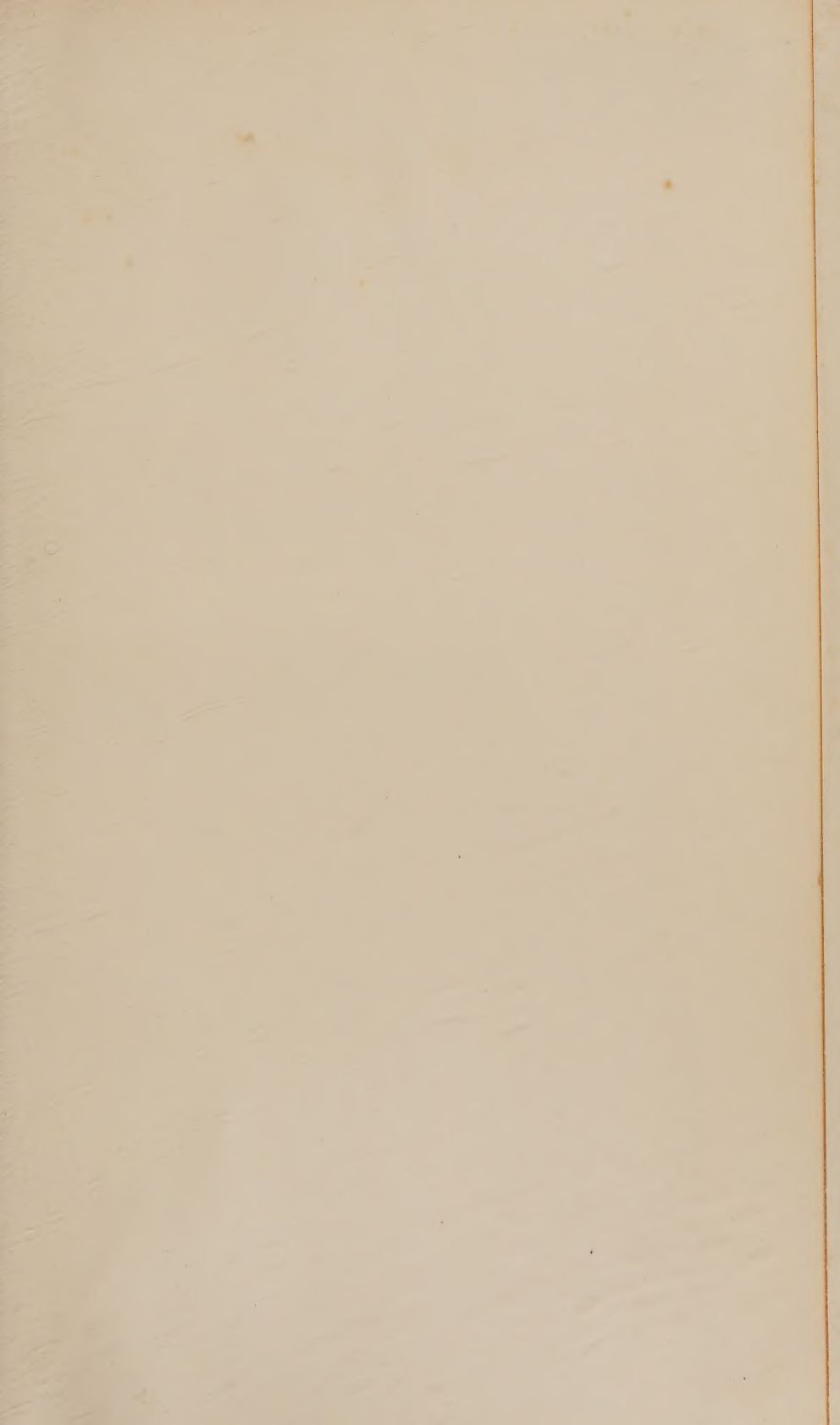
- BEHREND, HERTA. Notiz über die Wirkung intermittierenden Lichtes auf das Wachstum der Diatomeen. S. 531.
- BÖMEKE, H. Über die Ernährungs- und Wachstumsfaktoren der Nitrifikationsbakterien. S. 63.
- Die obligate Autotrophie der Nitrifikationsbakterien. S. 271.
- BORTELS, H. Mikrobiologischer Beitrag zur Klärung der Ursachenfrage in der Meteorobiologie. S. 450.
- BRENDEMÜHL, INGE. Über die Verbreitung der Erddiatomeen. S. 407.
- BURCIK, ERWIN. Eine Kritik der Symbiosetheorie von H. SCHANDERL auf Grund neuerer eigener Untersuchungen. S. 309.
- Zur Methodik der Beweglichkeitsprüfung von Mikroorganismen. S. 534.
- DENFFER, DIETRICH v. Die planktische Massenkultur pennater Grunddiatomeen. S. 159.
- FISCHER, WILHELM K. Über einige Fehlerquellen bei Prüfung von Pflanzenteilen auf das Vorkommen von Bakterien. S. 343.
- Untersuchungen zur Stammfrage bei *Azotobacter chroococcum* Beij. S. 353.
- HOPF, MARIA. Untersuchungen über die natürliche Mikroflora des Bodens. S. 661.
- JOHANNES, HEINRICH. Zwei neue Arten der Saprolegniaceen. S. 594.
- KATHEN, HANS. Über die Ermittlung der chemischen Konstitution von Algenlipoiden mit Hilfe der Absorptionsmethode. S. 602.
- KOCH, WULF. Entwicklungsgeschichte und physiologische Untersuchungen an Laboratoriumskulturen der Rotalge *Trailliella intricata* Batters. S. 635.
- KÖHLER, W., siehe RIPPEL-BALDES, AUGUST.
- KÜHLWEIN, H. Beiträge zur Biologie und Entwicklungsgeschichte der Myxobakterien. 678.
- MOEWUS, FRANZ. Beiträge zur Systematik der Volvocalesgattung *Polytoma*. I. Die Arten mit kugeligen Formen. S. 542.
- MÜLLER, ADELHEID, und W. SCHWARTZ. Untersuchungen zur Erdölbakteriologie I. S. 291.
- NIETHAMMER, A. Zur Systematik der Pilzgruppe *Penicillium* Link. S. 46.
- PETERS, I., u. AUGUST RIPPEL-BALDES. Über das Vorkommen verschiedener Rassen von *Aspergillus niger* van Tiegh. im Boden. S. 203.
- PIETSCHMANN-MEYER, K., siehe RIPPEL-BALDES, AUGUST.
- PLOTHO, O. v. Untersuchungen an *Proactinomyceten*. S. 12.
- Farbstoffe und Antibiotica bei *Actinomyceten*. S. 142.
- REMY, ELLEN. Über niedere Bodenphycomyceten. S. 212.
- RIPPEL, KARL. Der biologische Säureabbau im Wein. S. 509.
- RIPPEL-BALDES, AUGUST, K. PIETSCHMANN-MEYER und W. KÖHLER. *Candida* (*Nectaromyces*) *Reukauffii* als Fettbildner. S. 113.
- siehe PETERS, I.
- Über die angebliche Stickstoffbildung durch Nicht-Leguminosen. S. 332.

- ROBERG, MAX. Über die Lebensdauer von *Aspergillus*-Kulturen. S. 1.
— unter Mitarbeit von GEORG KIERA. Keimung verschieden alter Konidien in *Aspergillus* und Wachstum aus ihnen gezogener Mycelien. S. 705.
- SCHWARTZ, W., siehe MÜLLER, ADELHEID.
- STILLE, BERND. Die Sporenkeimung von *Aspergillus glaucus* in Abhängigkeit von Temperatur und relativer Luftfeuchtigkeit. S. 108.
— Untersuchungen über den Kältetod bei Mikroorganismen. S. 554.
- SUOMALAINEN, HEIKKI. Über die Anpassung der Bäckerhefe an Galaktose. S. 154.
- WINDISCH, SIEGFRIED. *Sporobolomyces holsatius* n. sp. S. 287.
- WINDISCH, SIEGFRIED. Zur Frage der Endokonidienbildung bei *Sporendonema casei* Desm. S. 539.
- WINTER, A. GERHARD. Untersuchungen über die Beziehungen zwischen *Ophiobolus graminis* und anderer Organismen mit Hilfe der Aufwuchsplattenmethode. S. 240.
— Weitere Beobachtungen über das Zusammenleben von *Ophiobolus graminis* und anderer Bodenmikroben mit Hilfe der Aufwuchsplatten. S. 588.
- WITSCH, HANS v. Erfahrungen und Bemerkungen zum *Phycomyces*-Test auf Vitamin B₁. S. 99.
— Physiologischer Zustand und Wachstumsintensität bei *Chlorella* S. 128.









DATE DUE



10 002027763

UNIVERSITY OF HAWAII

PERIODICAL

